

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Johanka Kučerová

Úloha exprese buněčného prionového proteinu v diferenciaci neuronálních buněčných linií

Role of expression of cellular prion protein in the differentiation of neuronal cell lines

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

doc. Ing. Karel Holada, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 01. 05. 2016

.....
Johanka Kučerová

Poděkování

Mé poděkování patří především mému školiteli doc. Ing. Karel Holadovi, Ph.D., který trpělivě vedl mé snahy o vědu a díky němuž jsem tuto práci dokončila. Dále pak Mgr. Zuzaně Jindrové, se kterou jsem na tomto tématu nejvíce spolupracovala a která mi byla velkou oporou. Mé díky patří také RNDr. Tiboru Moškovi, Ph.D. za pomoc při přípravě buněčných linií, Mgr. Zdeňce Hanusové a Mgr. Marcelu Filipové a vše ostatním členům Prionové laboratoře. A v neposlední řadě také rodině za jejich podporu.

Abstrakt

Buněčný prionový protein PrP^C je membránově vázaný glykoprotein, který se běžně vyskytuje u obratlovců, především v nervové soustavě, ale také například v buňkách gastrointestinálního traktu, v kostní dřeni, v pohlavních buňkách či v srdci. PrP^C je zároveň nezbytným pro patogenезi prionových chorob, smrtelných onemocnění bez možnosti léčby. Patogenní izoforma PrP^{Sc}, vznikající změnou sekundární struktury PrP^C, je základním stavebním kamenem infekční prionové částice, jenž se akumuluje v mozku postižených jedinců a tento děj je spojen s neurodegenerací. Samotná fyziologická úloha PrP^C v organismu však nebyla dosud objasněna, při vyřazení genu pro PrP^C (*PRNP*), nebyl pozorován fenotypový rozdíl. Potencionální funkce PrP^C jsou spojovány s anti-apoptotickými účinky, metabolismem iontů či ochranou před oxidačním stresem. Výsledky z poslední doby současně naznačují, že by PrP^C mohl hrát důležitou roli v buněčné diferenciaci. V průběhu diferenciace by protein mohl mít vliv na vývoj a typizaci buněk, ovlivňovat průběh buněčného cyklu a podílet se na utváření nervové soustavy. Cílem této práce je zmapování míry dopadu snížení exprese PrP^C na buněčnou diferenciaci a vlivu prionové infekce na diferenciaci neuronální buněčné linie (CAD 5), která je schopná propagovat priony. V rámci této práce byly porovnávány linie CAD 5 s fyziologickou expresí PrP^C s transdukovánými liniemi CAD 5, které mají expresi sníženou pomocí RNA interference. Zároveň se práce zabývá vlivem prionové infekce kmene RML (onemocnění scarpie adaptované na myši) na diferenciaci buněčné linie CAD 5. Linie byly porovnány po morfologické stránce, v růstové/diferenční křivce a v expresi neuron specifického markeru GAP-43, společně s expresí samotného PrP^C. Během sedmidenní diferenciace se u linie CAD 5 až pětkrát zvýšilo množství PrP^C. V průběhu morfologické studie mezi liniemi s normální expresí PrP^C (WT) a liniemi s expresí PrP^C sníženou (LP1 a LP2), nebyl pozorován rozdíl v diferenciaci. U RML kmenem infikované linie CAD 5 byl pozorován rozdíl během prvních tří dnů diferenciace, kdy u infikované linie docházelo k pozdější morfologické změně tvaru, než u WT linie. Expres diferenciálního neuronálního markeru GAP-43 u WT linie byla shodná s expresí u linií se sníženým množstvím PrP^C, shodná byla i v porovnání s expresí u infikované linie. Z výsledků této práce nevyplývá rozdíl mezi liniemi s běžnou a sníženou expresí PrP^C po morfologické stránce nebo ve schopnosti exprese proteinů. Rozdíl mezi infikovanou RML linií a WT linií byl pozorován v morfologii během časně fáze diferenciace. Nalezený rozdíl v dynamice diferenciace priony infikovaných buněk by mohl být jedním z faktorů přispívajících k poškození mozku u prionových onemocnění.

Klíčová slova

Prion, PrP^{Sc}, PrP^C, *PRNP*, Diferenciace, Down-regulace

Abstract

Cellular prion protein (PrP^C) is a membrane bound glycoprotein. The protein is expressed in all vertebrates, mainly in the nervous system, but it is present also in the cells of gastrointestinal tract, bone marrow, germ cells and heart. PrP^C is necessary for pathogenesis of prion diseases, which are deadly and without the possibility of therapy. The pathogenic isoform of prion protein is formed by changing of secondary structure of PrP^C and it's the main constituent of infectious prion particles. Pathological form of prion protein accumulates in brain of infected patients and this process is associated with neurodegradation. Physiological function of PrP^C is poorly understood. Knock-out of the PrP^C gene (*PRNP*) is not connected with any noticeable phenotype. Potential functions of PrP^C are dispersed, protein may have antiapoptotic effect, it can be involved in ions metabolism or in protection against oxidative stress. Latest results show, that PrP^C can play important role in cell differentiation. During the differentiation PrP^C can influence the development of cells and their typing. It could affect cell cycle and have an influence on formation of nervous system. Aim of the present study was to elucidate, whether the down-regulation of PrP^C or infection with prions has an impact on differentiation of neuronal cell line CAD 5. This thesis compares cell lines of CAD 5 with physiological expression of PrP^C and transduced lines of CAD 5, with lower expression of PrP^C due to RNA interference. This work also looks into the influence of RML strain infection (scrapie adapted to mouse) in differentiation of CAD 5 cells. The lines were compared in their morphology, in ability of growing and differentiation, in expression of neuron-specific marker GAP-43 and in the expression of PrP^C. During seven days of differentiation the amount of PrP^C increased five times. The morphology study didn't found significant differences between normal PrP^C expressing cells (WT) and cells with down-regulated PrP^C (LP1 and LP2). There has been a difference in the morphology of RML infected cells during first three days of differentiation, when infected cells changed their morphology later than healthy cells. Expression of marker of differentiation GAP-43 in WT – healthy CAD 5 cells was similar to lines with down-regulation of PrP^C and infected cells. The results of this study do not provide any evidence that there is a difference in morphology or expression of GAP-43 in CAD 5 with normal expression of PrP^C and CAD 5 with down-regulation of PrP^C. Different morphology between healthy and RML infected cells was observed during early differentiation. The difference in the dynamic of differentiation of prion infected cells could be one of factors contributing to the brain damage during prion diseases.

Key words

Prion, PrP^{Sc}, PrP^C, *PRNP*, Differentiation, Down-regulation

Obsah

1	Úvod	6
2	Přehled literatury	6
2.1	Patologický prionový protein (PrP^{Sc})	6
2.2	Buněčný prionový protein (PrP^C)	9
2.3	Fyziologická funkce PrP^C	10
2.4	Úloha PrP^C v diferenciaci	11
3	Materiál	15
4	Použité přístroje	18
5	Metodika	19
5.1	Buněčné linie	19
5.1.1	Linie CAD 5	19
5.1.2	Infekční linie CAD 5	19
5.1.3	Ko-transfekční linie	19
5.1.4	Linie se sníženou expresí PrP^C - LP1 a LP2	20
5.1.5	Příprava nových linií - LP1 a LP2	20
5.1.6	Kultivace buněk	21
5.2	Cell Counting Kit-8 (CCK-8- assay)	21
5.3	iCELLigence systém	22
5.4	Focení morfologie	22
5.5	Western blot	22
5.6	Reverzní transkripce (RT) + PCR	23
5.6.1	RT	23
5.6.2	PCR	23
5.6.3	qPCR	24
6	Výsledky	25
6.1.1	Expres PrP^C v průběhu diferenciaci	25
6.1.2	Expres <i>PRNP</i> genu	25
6.1.3	Expres neuron specifického proteinu GAP-43	26
6.2	Porovnání linií s down-regulací PrP^C s kontrolními CAD 5	27
6.2.1	Kontrola snížení exprese PrP^C	27
6.2.2	Morfologie	28
6.2.3	Měření schopnosti diferenciaci LP1 a LP2 pomocí systému iCELLigence	32
6.2.4	Viabilita linií	34

6.3	<i>Vliv infekce RML kmenu prionu na buněčnou diferenciaci CAD 5</i>	35
6.3.1	Diferenciace u RML infikované linie.....	35
6.3.2	Morfologie	36
6.3.3	Měření schopnosti diferenciaci infikované linie pomocí systému iCELLigence	37
6.4	<i>Příprava nové down-regulované linie LP1 a LP2 a srovnání s předchozími.....</i>	38
6.4.1	Morfologie	38
6.4.2	Expres GAP-43 u LP1 a LP2 linií.....	41
6.4.3	Měření schopnosti diferenciaci nových linií pomocí systému iCELLigence	42
7	Diskuze	44
7.1.1	Diferenciace buněk CAD 5	44
7.1.2	Změna exprese PrP ^C u diferencovaných buněk CAD 5.....	44
7.1.3	Vliv snížení exprese PrP ^C na diferenciaci buněk CAD 5	45
7.1.4	Vliv infekce RML na diferenciaci buněk CAD 5.....	46
8	Závěr	48
9	Reference	49

Cíle práce

Cílem této práce je zmapování vlivu exprese PrP^C na diferenciaci neuronální buněčné linie CAD 5, která je schopná propagovat priony.

Konkrétní cíle jsou:

- zjištění, zda míra exprese PrP^C má vliv na diferenciaci buněčné kultury CAD 5,
- objasnění vlivu prionové infekce na diferenciaci buněčné kultury CAD 5.

Zkratky

<u>Zkratka</u>	<u>Český jazyk</u>	<u>Anglický jazyk</u>
AK	Aminokyselina	Amino acid
BGS		Bovine Growth Serum
cDNA	Komplementární DNA	Complementary DNA
CNS	Centrální nervová soustava	Central nervous system
CTD	C-terminální doména	C-terminal domain
EBs	Embryoidní tělíska	Embryoid bodies
EGFP		Enhanced Green Fluorescent Protein
ER	Endoplasmatické retikulum	Endoplasmic reticulum
ESC	Embryonální kmenové buňky	Embryonic Stem Cell
FGS		Fetal bovine serum
GAP-43		Growth Associated Protein - 43
GAPDH		Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFAP		Glial fibrillary acidic protein
hESC	Lidské embryonální kmenové buňky	human Embryonic Stem Cell
HSC	Hematopoetické kmenové buňky	Hematopoietic stem cell
KD		Knock-down
KO		Knock-out
mRNA		Messenger RNA
MEL		Murine erythroleukemia cells
MSC	Mezenchymální kmenové buňky	Mesenchymal stem cells
N-CAM		Neural cell adhesion molecule
NK	Nukleová kyselina	Nucleic acid

NTD	N-terminální doména	N-terminal domain
PCR	Polymerázová řetězová reakce	Polymerase chain reaction
PK	Proteináza K	Proteinase K
PNS	Periferní nervová soustava	Peripheral nervous system
PrP ^C	Buněčný prionový protein	Cellular prion protein
PrP ^{Sc}	Scrapie prionový protein	Scrapie prion protein
RA	Kyselina retinová	Retinoic acid
RT	Reverzní transkripce	Reverse transcription
shRNA		Small hairpin RNA
shRNAmiR		Small hairpin microRNA
SNAP-25		Synaptosomal-associated protein – 25
TSE	Transmisivní spongiformní encefalopatie	Transmissible spongiform encephalopathy
qPCR		Quantitative PCR
WT		Wild type

1 Úvod

Diferenciace je unikátní schopnost buněk měnit svůj fenotyp, provázená změnou proliferace, odlišnou morfologií a rozdílnou transkripcí genů s funkcí specificky danou pro buněčný typ. Umožňuje systematicky vytvářet sofistikované celky buněk s determinovanými funkcemi, ačkoliv původní kmenová buňka byla společnou pro jednotlivé buněčné typy. Proces diferenciace je regulován faktory, které tento různý vývoj startují a ovlivňují. Mezi tyto faktory by krom jiných mohl patřit i buněčný prionový protein (PrP^C), jehož množství se během diferenciace u myších neuronálních buněk CAD 5 až pětinasobně zvyšuje (Hanusova et al. 2015). Tento protein je běžnou součástí mnoha buněčných typů u obratlovců, jeho hlavní fyziologická úloha však zůstává neobjasněna, ačkoliv mu je připisován vliv na mnohé funkce v rámci buňky i organismu. V největším množství se PrP^C vyskytuje na povrchu nervových buněk, je tedy nasnadě jeho možný vliv na vývoj a funkci nervové soustavy (Linden et al. 2008). Na membránách by jako vazebný partner mohl zastávat určitou úlohu v signálních kaskádách, svou expresí a vazbou na jiné molekuly by mohl ovlivňovat proliferaci, diferenciaci, apoptózu či oxidační stres (Linden et al. 2008). PrP^C je v popředí pozornosti především z důvodu účasti své patogenní izoformy - prionového proteinu (PrP^{Sc}), majoritního hráče v patogenezi prionových chorob. Prionová onemocnění jsou na vědeckém poli poměrně novým tématem. První případ klusavky (scrapie) byl zaznamenán v 18. století, na počátku 20. století bylo popsáno první lidské onemocnění - Creutzfeldt-Jakobova nemoc (Zabel a Reid 2015). V druhé polovině 20. století byly tyto choroby sdruženy do skupiny zvané Transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE) a roku 1982 byl za jejich zdroj označen protein PrP^{Sc}, izoforma běžného buněčného proteinu PrP^C, jehož úloha v organismu zůstává doposud neznámou. Odhalení funkce PrP^C by mohlo přispět k pochopení mechanismu neurodegenerace u prionových chorob a nalezení účinné léčby pro tato smrtelná onemocnění.

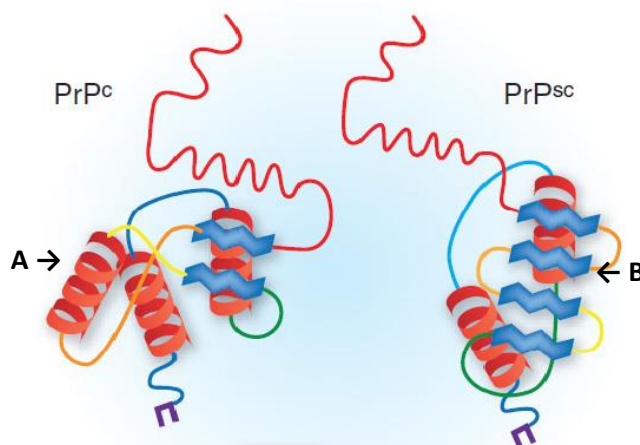
2 Přehled literatury

2.1 Patologický prionový protein (PrP^{Sc})

Patogenní izoforma – prion (proteinaceous infectious particle), byla označena jako jediný zdroj infekce prionových onemocnění. Tato protein-only teorie vylučuje možnost vzniku prionové choroby pomocí virů, viroidů či bakterií (Prusiner 1982). Přenos tohoto onemocnění je unikátní, informace potřebná k přenosu onemocnění se neváže (jako je tomu u zmiňovaných virů a bakterií) na DNA informaci, ale pouze na změněnou sekundární strukturu PrP^{Sc} proteinu, přičemž primární zůstává nezměněna. Tato patologická konformace je z pohledu buňky dědičná, může se šířit organismem a být přenosná i na jiné jedince v rámci stejného druhu či mezidruhově (Prusiner 1982).

Konverzí běžné buněčné formy (Obrázek 1) vzniká protein, který v sekundárním uspořádání obsahuje větší množství (54%) β -skládaných listů a menší (21%) α -helixu (Pan et al. 1993). Fyziologický PrP^{C} oproti infekční partikuli obsahuje strukturu β -skládaného listu pouze ze 3% a naopak se zde hojně (52%) vyskytuje α -helix (Pan et al. 1993). PrP^{Sc} je z části štěpen na N-konci proteinázou K (PK) na 27-30kDa velký rezistentní zbytek (150 AK), který může být detekován např. na western blotu, naproti tomu PrP^{C} je degradován zcela. PrP^{Sc} je oproti fyziologické formě proteinu nerozpustný v neionogenních detergentech jako je např. Triton X-100 a rezistentní vůči UV či ionizujícímu záření (Pan et al. 1993). Zvýšená odolnost k degradaci má za následek špatné odbourávání organismem a dochází k akumulaci proteinu v mozkové tkáni za vzniku intracelulárních depozit a extracelulárních amyloidních plaků, které zřejmě přispívají ke vzniku onemocnění (Pan et al. 1993).

Tyto plaky však nejsou nezbytné pro průběh prionového onemocnění. Příkladem může být neurodegenerace BSE infikovaných myši, u kterých nebyly detekovány rezistentní plaky prionového proteinu (Lasmézas et al. 1997). Předpokládá se, že ke změně běžné fyziologické formy na infekční dochází na povrchu buněčných membrán – na lipidických raftech či v endocytické dráze/v lysosomech jako pozdní posttranslační děj (Naslavsky et al. 1997). Mechanismus buněčné toxicity a neurodegenerativního působení prionů stále není objasněn.



Obrázek 1; Rozdílná sekundární struktura mezi PrP^{C} a PrP^{Sc} . Převzato a upraveno z (Wilson a Nixon 2009). Běžná PrP^{C} struktura obsahuje 3 α -helixy (A). Oproti tomu infekční forma obsahuje především strukturu β -skládaného listu (B). Rozdíl v sekundární struktuře zvyšuje odolnost a protein má tendenci formovat agregáty, kumulující se v mozku.

Prionová onemocnění neboli transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE), postihující člověka (Tabulka 1) a zvířata (Tabulka 2), spadají do skupiny neurodegenerativních onemocnění společně s Alzheimerovým onemocněním, Parkinsonismem či Huntingtonovou chorobou. Mají společný znak - akumulaci špatně sbalených proteinů za vzniku amyloidních plaků a fibril, spojené s poškozením nervové tkáně mozku (Ross a Poirier 2004; Goedert et al. 2010). Jedním z rozdílů mezi těmito chorobami je četnost případů v populaci, například v České republice bylo v letech 2002-2012 diagnostikováno 111 případů Creutzfeldtovy-Jakobovy choroby (Goedert et al. 2010; Rohan et al. 2013). Oproti tomu počet pacientů, u kterých byla diagnostikována Alzheimerova choroba v ČR, byl do roku 2010 přibližně sto tisíc (Baroš a Hasalíková 2010). Ročně je celosvětově diagnostikován průměrně jeden případ TSE na milion obyvatel (Collinge 2001).

Nejvýznamnější odlišnost mezi těmito neurodegenerativními chorobami je prokázaná možnost infekce priony, která platí výlučně pro prionová onemocnění. K infekci může docházet při perorálním podání kontaminovaného krmiva (např. BSE, Kuru) nebo iatrogenní infekcí – injekce/transplantace infikované tkáně či nedostatečně dekontaminovanými chirurgickými nástroji. Při perorální infekci (v závislosti na typu infekčního kmenu prionu) může docházet k primární akumulaci PrP^{Sc} v lymfoidních tkáních asociovaných se střevy, jako jsou lymfatické uzliny, slezina či Peyerovy pláty (Mabbott a MacPherson 2006). Předpokládá se, že do nervové soustavy se priony následně z těchto tkání dostávají pomocí sympatických a parasympatických nervových vláken (Mabbott a MacPherson 2006). Imunitní systém je v tomto případě slepý, odlišně strukturovaný PrP^{Sc}, který slouží jako templát pro konverzi dalších molekul PrP^C na patogenní proteiny, nevyvolává žádnou imunitní odpověď.

Kromě infekčního přenosu (<2% případů) TSE mohou vznikat sporadicky (90% případů) nebo dědičnou mutací v genomu (10% případů), nejčastěji substituční záměnou AK v C-terminální doméně (Imran a Mahmood 2011). Pro onemocnění jsou společnými znaky dlouhá inkubační perioda před nástupem klinických projevů, poruchy kognitivních a pohybových funkcí, demence. V mozkové tkáni dochází ke spongiózním změnám, akumulaci amyloidu a odumírání neuronů. Masivní neurodegenerace poškozuje různé části mozku, včetně centra koordinace, cerebrálního kortexu, thalamu a mozečku (Collinge a Clarke 2007).

Onemocnění	Přenos a vznik
sCDJ (sporadická Creutzfeldt-Jakobova nemoc)	Spontánní konverze na PrP ^{Sc} či somatická mutace
vCJD (variantní CJD)	Infekce priony BSE; krevní transfuze
iCJD (iatrogenní CJD)	Infekce priony lidského původu po transplantaci
f/gCJD (familiární; genetická CJD)	Mutace v <i>PRNP</i> genu; dědičné
GSS (Gertsmann-Straussler-Scheinker syndrom)	Mutace v <i>PRNP</i> genu
FFI (Fatální familiární insomnie)	Mutace <i>PRNP</i> v germinální linii
Kuru	Rituální kanibalismus
sFI (sporadic fatal insomnia)	Spontánní konverze na PrP ^{Sc} či somatická mutace
VPSPr (Variably protease-sensitive prionopathy)	Spontánní konverze na PrP ^{Sc} či somatická mutace

Tabulka 1; Lidská prionová onemocnění, převzato a upraveno z (Mabbott a MacPherson 2006; Imran a Mahmood 2011)

Onemocnění	Hostitel
Scrapie (Klusavka)	Ovce, kozy
BSE (Bovinní spongiformní encefalopatie)	Skot
CWD (Chronické chřadnutí jelenovitých)	Jeleni, Los
TME (Transmissible mink encephalopathy)	Norek
FSE (Feline spongiform encephalopathy)	Kočkovité šelmy
EUE (Exotic ungulate encephalopathy)	Kudu, Nyala

Tabulka 2; Zvířecí prionová onemocnění, převzato a upraveno z (Mabbott a MacPherson 2006; Imran a Mahmood 2011)

U přenosu infekce existuje mezidruhov^á bariéra, která ovlivňuje efektivitu šíření PrP^{Sc}. Tato bariéra je dána sekvenčním polymorfismem v genu *PRNP*, vzniká tak variabilita v aminokyselinovém složení proteinu mezi jednotlivými živočišnými druhy (Collinge 2001).

K výzkumu prionu a prionových onemocnění se využívají buněčné linie, schopné propagace prionu nebo zvířecí modely, a na ně adaptované infekční kmeny prionu. Jednotlivé kmeny (konformační varianty) se mezi sebou liší zastoupením glykosylačních forem: mono-, di-, či neglykosylovanou formou proteinu, velikostí fragmentu po štěpení PK, délkou inkubační fáze před nástupem symptomů, distribucí spongiformních změn, lokací PrP^{Sc} deposit v centrální nervové soustavě (CNS) a akumulací PrP^{Sc} v odlišných tkáních při infekci (Arima et al. 2005). Pro výzkum se často z důvodu vysoké exprese PrP^C a schopnosti propagace prionů využívají myší neuronální linie buněk a na myši adaptované prionové kmeny jako např. RML (scrapie), Chandler (scrapie), Fukuoka (GSS syndrom), myší BSE, myší vCJD.

2.2 Buněčný prionový protein (PrP^C)

PRNP gen kódující PrP^C se v genomu vyskytuje v jedné kopii, obsahuje dva (např. člověk) či tři (např. myš) exony. Kódující exon je vždy přítomný jako poslední v pořadí. Lidský *PRNP* o velikosti 16kb se nachází na krátkém raménku 20. chromozomu (20q13), u myši je lokalizován na 2. chromozomu (Sparkes et al. 1986; Puckett et al. 1991). Homologie mezi myším a lidským PrP^C se pohybuje okolo 90% (Stahl a Prusiner 1991).

Genová rodina prionových proteinů mimo PrP^C obsahuje další tři homologní členy. *PRND* (Doppel protein) se nachází 16-52kb „downstream“ od *PRNP*, ovlivňuje vývoj samčích pohlavních orgánů (varlat) a má vliv na fertilitu; *PRNT* (PRT protein) je ve stejném genomickém clustru jako *PRNP* (3-6kb „downstream“) a nachází se také v pohlavních buňkách (Allais-Bonnet a Pailhoux 2014). Oba geny pravděpodobně vznikly v evoluci duplikací *PRNP*. Třetí gen *SPRN* (Shadoo protein) se nachází na jiném chromozomu, je především přepisován v CNS, avšak v menším množství než *PRNP* (Allais-Bonnet a Pailhoux 2014).

Detekovat mRNA a samotný protein je možné od raného vývoje embrya nejen v neuronech, ale také v různé míře ve svalových buňkách, leukocytech a dalších orgánech jako jsou ledviny, gastrointestinální trakt, varlata, plíce, krev (Manson et al. 1992; Hidaka et al. 2010; Aucouturier a Carnaud 2002).

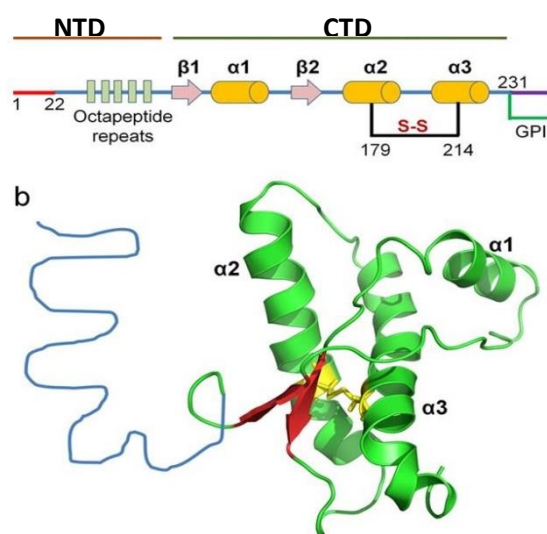
Maturovaný savčí protein (Obrázek 2) tvoří 208 AA a obsahuje dvě strukturní domény: N-terminální (NTD) a C-terminální (CTD). Pomocí CTD může být protein připojen prostřednictvím GPI kotvy na membránu buněk (Singh a Udgaonkar 2015). CTD tvoří dva krátké β -skládané listy a tři delší α -helixy, z nichž $\alpha 2$ s $\alpha 3$ jsou propojeny disulfidickým můstkem. Dále se na proteinu nalézají dvě možná místa pro N-glykosylaci. NTD obsahuje sérii čtyř nebo pěti po osmi se opakujících aminokyselinách (tzv. oktarepetice), schopných vázat dvoumocné kationty, jako jsou měď či zinek (Singh a Udgaonkar 2015).

Biosyntéza PrP^C probíhá na drsném endoplasmatickém retikulu (ER). Následně v lumen ER probíhají další post-translační úpravy – odštěpení signálního peptidu na N-konci, N-glykosylace,

tvorba disulfidického můstku a připojení GPI kotvy spojené s odštěpením C-koncové sekvence (Harris 2003). Odtud je protein transportován do Golgiho aparátu (GA), kde je upraven navázaný oligosacharid připojením sialové kyseliny (Harris 2003).

Následně je protein exportován na buněčný povrch do oblasti lipidických raftů, bohatých na sfingolipidy a cholesterol, kde je v rámci buňky převážně lokalizován (Naslavsky et al. 1997). Z membrány může PrP^C endocytózou putovat pomocí klatrinových váčků do časného endosomu a cyklicky se vracet zpět na membránu (Harris 2003).

V průběhu syntézy mohou vzniknout dvě transmembránové varianty (^{Ntm}PrP, ^{Ctm}PrP) s doposud neobjasněnou funkcí. Nicméně varianta, která je napojena na GPI kotvu a exportována na membránu, je majoritní (Harris 2003).



Obrázek 2; Savčí buněčný prionový protein převzato a upraveno z: (Singh a Udgaonkar 2015). N-konec proteinu obsahuje na pozici 1-22 AK signální sekvenci, která je v ER odštěpena. Následuje N-terminální doména (NTD) proteinu (23-120), která je nestrukturovaná a obsahuje sérii oktarepetic. C-terminální doména (CTD) (121-231) se skládá ze tří α -helixů; α 1 (144-156), α 2 (174-194), α 3 (200-228) a dvou β -skládaných listů; β 1 (128-131), a β 2 (161-164). Na C-konci proteinu (231-253) se nachází signální peptid pro připojení GPI kotvy. α 2 je spojena SS-můstkem k α 3. Glykosylace probíhá na Asn 181 a Asn 197.

2.3 Fyziologická funkce PrP^C

Dosud uspokojivě nezodpovězenou otázkou zůstává funkce buněčného prionového proteinu. U obratlovců je PrP^C exprimován v měnícím se množství, u širokého spektra buněčných typů, během embryonálního vývoje i dospělosti, a část jeho sekvence je evolučně konzervovaná (Büeler et al. 1992). Přesto se myši s odstraněným genem pro buněčný prionový protein, během sedmiměsíčního vývoje nikterak nelišily v růstu, v chování, ve fertilitě, v imunologických defektech od kontrolních myších linií (Büeler et al. 1992). Jedinou změnou bylo, že tyto myši byly zcela rezistentní k prionové infekci. Některé z pozdějších prací poukázaly na variabilitu mezi zdravými a infikovanými myšmi jedinci ve vyšším věku. Rozdíly byly popsány v cirkadiánním rytmu, ve spacím vzorci (Tobler et al. 1996) nebo byly pozorovány změny v kapacitě dlouhodobé

paměti (Nishida et al. 1997). Mnozí autoři nastínili jeho možné role v rámci organismu, nicméně majoritní fyziologická úloha zůstává doposud neobjasněna.

Funkce spojené s lokalizací

PrP^C je na buněčném povrchu lokalizován v oblastech buněčných raftů (Naslavsky et al. 1997), v místě zvýšené koncentrace signálních proteinů, které mohou mezi sebou vzájemně interagovat a jsou schopné spouštět transmembránovou signalizaci. Jako možní vazební partneři PrP^C jsou uváděni např. N-CAM (Schmitt-Ulms et al. 2001), který se podílí na signalizaci neuronálního růstu, laminový receptorový prekurzor (LRP) (Gauczynski et al. 2001), stres-indukující protein (STI-1) fungující jako heatshock protein s neuroprotektční funkcí např. v retině či hipokampu, Bcl-2 (Kurschner a Morgan 1995) apoptotický regulátor, EGFR (Epidermal growth factor receptor) podporující růst a vývoj nervové soustavy (Monnet et al. 2004). Signalizace prostřednictvím těchto interakcí s PrP^C by mohly mít na buňky pozitivní vliv v průběhu vývoje a chránit je před apoptózou.

Funkce spojené se strukturou

N-terminální část domény proteinu obsahuje sérii repetitivních obsahujících histidin s glycinem a tvoří vazebné místo pro různé dvoumocné kationty jako jsou Zn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺ (Choi et al. 2006). Na tuto nestrukturovanou část se může navázat 5-6 Cu²⁺, které endocytózou prochází do buňky a PrP^C by se tak mohl podílet na regulaci homeostáze mědi v buňce (Brown et al. 1997). Díky své schopnosti vazby Cu²⁺ na NTD se o PrP^C uvažuje jako o možném receptoru chránícím před oxidačním stresem. Buněčné linie s vyřazeným genem pro PrP^C měly sníženou aktivitu Cu/Zn super oxid dismutázy (SOD-1), která se podílí na odstranění kyslíkových radikálů, a tyto buňky byly citlivější k oxidačnímu stresu (Pauly a Harris 1998).

Funkce spojené s expresí

Jako nezbytný se PrP^C ukázal při obnově kostní dřeně (hematopoetických kmenových buněk - HSC), kde je exprimován u více než 40% buněk. Za fyziologických podmínek se nepřítomnost PrP^C neprojevuje. Pokud dojde k letálnímu ozáření myších recipientů a následné sériové transplantaci donorových HSC bez PrP^C, s první transplantací v sérii přežívají všichni recipienti, v druhé sérii pouze polovina a v třetí sérii již žádný (Zhang et al. 2006). Hematopoetické kmenové buňky, které neobsahují PrP^C, nejsou schopny rekonstrukce hematopoetického systému, a ukazují tak na nezbytnost tohoto proteinu za stresových podmínek (Zhang et al. 2006).

Nejvíce se PrP^C exprimuje v nervové soustavě, především v neuronech, méně v buňkách gliových, kde by mohl ovlivňovat jejich vývoj - proliferaci, diferenciaci.

2.4 Úloha PrP^C v diferenciaci

Raný embryonální vývoj

K expresi *PRNP* genu dochází již od časného embryonálního vývoje myši (E6-7) v kontextu s ostatními geny, v centrální/periferní nervové soustavě, ve specifických populacích buněk jiného než neuronálního původu a v extra-embryonální tkáni (Manson et al. 1992). Pomocí LacZ reportérového systému řízeného PrP promotorem, který v prostoru a čase odpovídá expresi genu *PRNP* - tedy proteinu PrP^C, byla v raném embryonálním vývoji myši detekována jeho

zvyšující se exprese ve specifických buňkách v CNS, PNS, srdci, ledvinách, varlatech, skeletárních svalech, slinivce, thymu, kůži či v žaludku (Tremblay et al. 2007). U těchto embryí nebyla detekována exprese PrP u mitoticky aktivních neurálních progenitorových buněk ventrální části mozku. A naopak ke zvýšení exprese došlo u neuronů, které migrovaly mimo tuto oblast a diferencovaly v neurony intermediální vrstvy mozku. Odlišné množství PrP tak indikuje, že exprese *PRNP* v nervové soustavě začíná post-mitoticky společně s procesem neurální diferenciace (Tremblay et al. 2007). Odlišná časová a prostorová exprese PrP^C byla také pozorována u časného embryonálního vývoje skotu (Peralta et al. 2012).

Schopnost PrP^C ovlivnit diferenciaci a proliferaci ESC (Embryonální kmenové buňky) by mohl být vysvětlen interakcí mezi PrP^C a klíčovými proteiny charakteristickými pro pluripotentní buňky. U myších embryí se sníženou expresí genu *PRNP* byla pozorována 6,5. - 7,5. den vývoje změna exprese mRNA genů, například genů spojených s modulací buněčné adheze a ukládání extracelulární matrix (Khalife et al. 2011). Ovlivněna byla exprese růstových faktorů, došlo např. k zvýšení exprese Oct-4, jednoho z hlavních faktorů pluripotence u myších ESC (Khalife et al. 2011). U transkripčního faktoru Oct-4 ve spojitosti s expresí PrP^C během diferenciace byla popsána vzájemná nepřímá úměra, kdy při indukované diferenciaci pomocí kyseliny retinové (RA) došlo ke snížení množství Oct-4 a zvýšení množství PrP^C (Peralta et al. 2011).

Možnost vzájemné interakce buněčného prionového proteinu s Oct-4 byla také pozorována během třináctidenní diferenciace WT a knock-outovaných (KO) embryonálních kmenových buněk. Hladiny exprese Oct-4 se mezi WT a KO liniemi signifikantně lišily, KO linie měly 13. den za diferenciálních podmínek zvýšenou hladinu Oct-4 oproti WT, a také vyšší množství dalšího pluripotentního markeru - Nanog proteinu (Miranda et al. 2011). Prodloužení stavu pluripotence a pozdržení diferenciace, byl také pozorován u lidských ESC v případě zvýšeného množství PrP. Během kultivace hESC v přítomnosti rekombinantního PrP (se stejnou nativní konformací jako PrP^C) v mediu, docházelo k udržování vysoké proliferační aktivity a pozdržení spontánní diferenciace (Lee a Baskakov 2010). Buňky, které měly zvýšenou koncentraci PrP v extracelulárním prostředí, exprimovaly déle Oct-4, měly pozdější nástup exprese neuronálních diferenciálních markerů a sníženou expresi PrP^C. Jedním z možných vysvětlení opožděné diferenciace u hESC kultivovaných s PrP je down-regulace vlastního PrP^C (Lee a Baskakov 2010).

Obdobné výsledky byly pozorovány u hESC za snížení či zvýšení exprese PrP^C pomocí vložení vektoru shRNA-PrP^C, respektive genu pro PrP^C do hESC (Lee a Baskakov 2013). U těchto hESC se sníženou expresí PrP^C byla pozorována nižší hladina diferenciálních ektodermálních markerů jako je GAP-43. Naopak hESC, které měly zvýšenou expresi PrP^C, exprimovaly nižší množství proteinů charakteristických pro tři zárodečné linie a navíc měly tyto buňky vyšší proliferační aktivitu (Lee a Baskakov 2013).

Fyziologická hladina exprese *PRNP* pravděpodobně ovlivňuje přechod buněk z G1 do G2/G0 fáze, záleží v jakém kontextu je PrP^C navázán na širokou škálu možných vazebných ligandů, které dále modulují přechod buňky do diferenciální fáze. Linie, které mají zvýšenou nebo sníženou expresi *PRNP* jsou schopné diferencovat jako WT linie, nicméně zde patrně dochází k zastoupené funkci řady jiných molekul.

Vliv na diferenciaci odlišných buněčných typů

V průběhu oddělování a specializace jednotlivých buněčných typů byla pozorována odlišná exprese PrP^C, potenciálně by tak protein mohl ovlivňovat vývoj jednotlivých buněčných linií.

V kostní dřeni dochází k vývoji a oddělování jednotlivých linií leukocytů z kmenových buněk. Během vývoje lidských lymfocytů a monocytů byla detekována přítomnost PrP^C na povrchu jejich membrán, u granulocytů docházelo během diferenciaci ke snížení jeho množství (Dodelet a Cashman 1998). U myších maturovaných T-lymfocytů a B-lymfocytů v periferních lymfoidních orgánech je množství sníženo na minimum (Liu et al. 2001). U erytroidní řady nejprve dojde ke zvýšení exprese v erytroblastech, toto zvýšení je následováno poklesem exprese v průběhu maturace buněk v erytrocyty (Panigaj et al. 2011a).

Odlišná exprese PrP^C byla popsána během embryonálního vývoje prekursorů srdce. Na tvorbu tohoto orgánu jsou v embryu použity prekury buněk pro hladkou svalovinu, endoteliální buňky a kardiomyocyty. Kardiomyocyty jsou specificky pozitivní na expresi *PRNP*, oproti dalším přítomným typům buněk, a tento znak by se dal využít na specifickou selekci kardiomogenních prekursorů (Hidaka et al. 2010). Expresi PrP^C probíhá i ve svaly maturovaném.

U myši byla naměřena pomalejší regenerace při poškození svalové tkáně, pokud prekury myogenních buněk neexprimují *PRNP* (Stella et al. 2010). Mezi další typ tkáně, ve které je PrP^C přítomen, patří zubní tkáň, přesněji odontoblasty a ameloblasty (Zhang et al. 2011). V nepřítomnosti PrP^C v těchto liniích během formace lidských a myších zubů, byly zaznamenány malé detekovatelné rozdíly v diferenciaci a proliferaci (Zhang et al. 2011).

Vliv na formování a funkci nervové soustavy

Vývoj nervové soustavy provází organismus od rané embryogeneze, dochází k formování jednotlivých částí této tkáně, úseky se specializují do funkčních oddílů pod kontrolou mnoha růstových faktorů. Jednotlivé díly, neurony, se v průběhu vývoje dělí, polarizují, dochází k prodlužování jejich neuritů, resp. axonů a spojují se do funkčních sítí, které jsou navzájem odstíněny pomocí myelinizace. Přítomnost PrP^C v těchto buňkách by mohla působit jako růstový a diferenciaci faktor, který je součástí signálních kaskád komplexů s variabilními vazebnými partnery ovlivňující průběh vývoje nervové soustavy. Avšak přítomnost PrP^C se nejvíce jako esenciální a jeho funkce je pravděpodobně nahrazena. Porovnáním WT linií a linií se sníženou či KO expresí genu *PRNP* byl zjištěn pozitivní vliv na jednotlivé kroky vývoje, tedy na proliferaci neuronálních buněk (Steele et al. 2006; Prodromidou et al. 2014) a na diferenciaci neuronální linie (Peralta et al. 2011).

Morfologie a funkce nervové soustavy

Embryonální hipokampální buňky, které byly kultivovány za přítomnosti homologního rekombinantního PrP v mediu, vykazovaly rychlejší nabytí polarity, růst axonu a prodloužení neuritů (Kanaani et al. 2005). Oproti buňkám bez PrP v mediu byl také zvýšený počet mezibuněčných propojení podobných synapsím.

Myelinizace neuronů

Myši prenatální i maturované oligodendrocyty v předním mozku, které zajišťují především myelinizaci v CNS, při odstranění genu *PRNP* více proliferovaly a pozdržení diferenciaci korelovalo s pozdějším nástupem exprese diferenciaci markerů, např. Sox17, který reguluje

přechod z proliferační fáze do myelinizační fáze vývoje oligodendrocytů (Bribián et al. 2012). Avšak myelinizace či morfologie mozku nevykazovaly žádné abnormality, což poukazuje na možnost nahrazení funkce PrP^C jiným proteinem/proteiny, a tento vliv byl buněčně specifický (Bribián et al. 2012; Collinge et al. 1994). V periferní nervové soustavě myši byl u 60-týdnů starých jedinců za nepřítomnosti PrP^C pozorován proces demyelinizace, poukazující na nutnost exprese PrP^C v během stárnutí (Bremer et al. 2010).

Typizace nervových buněk

Nejvíce proteinu PrP^C je koncentrováno v nervové soustavě a hladina jeho exprese se v průběhu maturace neuronálních buněk může lišit mezi jednotlivými typy buněk (Steele et al. 2006). Roli může hrát i fáze buněčného cyklu, protože u mitoticky aktivních buněk bylo pozorováno nízké až nulové množství PrP^C (Steele et al. 2006). Například v myších neuronálních buňkách hipokampu bylo sledováno zvyšující se množství buněčného prionového proteinu během diferenciaci, oproti tomu toto nebylo detekováno v gliových buňkách (astrocyty, oligodendrocyty) (Steele et al. 2006). Obdobně odlišená exprese byla pozorována na lidských neuronálních progenitorových buňkách. Progenitorové buňky, které byly diferenciovány na neurony, měly vysokou hladinu exprese PrP^C a dalších markerů pro ně typických (nestin, β III tubulin, MAP-2) (Witusik et al. 2007). Naopak progenitorové buňky, které diferenciovaly na buňky gliové, měly sníženou expresi PrP^C a vysokou hladinu GFAP (Witusik et al. 2007).

Funkční mechanismus, jak je PrP^C schopen ovlivnit maturaci a funkci neuronů, zůstává nezodpovězený. Jedním z možných vysvětlení je cross-talk mezi PrP^C a signálními molekulami, které přímo ovlivňují život buňky a mohly by být vazebnými partnery, kteří v případě nepřítomnosti PrP^C jsou schopni tuto ztrátu kompenzovat. Příkladem může být například vazba PrP^C na STI-1, která měla anti-apoptotický vliv na kmenové buňky, a zároveň tato interakce podporovala jejich sebeobnovu (Santos et al. 2011). Další interakční partner by mohla být molekula N-CAM. N-CAM se nachází shodně jako PrP^C na povrchu membrán v lipidických raftech a pomocí aktivace prostřednictvím kinázy p59^{fyn} byla u myších neuronů hipokampu pozorována aktivace nervového růstu (Santucci et al. 2005). PrP^C by se také mohl prostřednictvím této interakce podílet na ukončení proliferační fáze s následnou diferenciací. U kmenových neurálních buněk s vyřazeným genem pro PrP^C bylo detekováno nahromadění buněk v proliferační fázi, na rozdíl od buněk exprimujících PrP^C, tyto buňky nediferenciovaly (Prodromidou et al. 2014).

V rámci této studie na modelu diferenciované tkáňové kultury CAD 5 byla snaha o vytvoření představy vlivu exprese PrP^C na diferenciaci a pochopení podstaty zvyšující se exprese PrP^C v jejím průběhu. Odlišné hladiny exprese byly pozorovány nejen u tkáňových kultur, ale také v průběhu embryonálního vývoje mozku, existuje tedy předpoklad, že změny v expresi PrP^C by se mohly podílet na vývoji nervové soustavy, jak na úrovni samotné buňky, tak i na úrovni celého nervového systému obratlovců. Pro tuto studii byly použity linie se sníženou expresí PrP^C, s následným pozorováním dopadu tohoto snížení na diferenciaci CAD 5 buněk. Dále byl sledován vliv prionové infekce RML na linii CAD 5, kde jsme předpokládali možnou ztrátu funkce u konformačně pozměněného PrP^{Sc}.

3 Materiál

Chemikálie

Agaróza	BioLine (UK)
BCIP/NBT	Merck Millipore (Německo)
Benzonáza	Novagen (Německo)
Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad (USA)
Complete	Roche (Švýcarsko)
DTT (DL-Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich (USA)
EDTA	Boehringer Mannheim(Německo)
Ethanol	Lach-Ner (ČR)
Fluoroshield s DAPI	Sigma-Aldrich (USA)
Glycerol 99%	Sigma Aldrich (USA)
HCL 35% p.a.	Penta (ČR)
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific (USA)
LB-Agar	Carl Roth (Německo)
Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent	Invitrogen (USA)
n-dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma-Aldrich (USA)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (USA)
Poly-Akrylamid/bis-akrylamid	Bio-Rad (USA)
Polybrene (Hexadimethrin Bromid)	Sigma Aldrich (USA)
Poly-D-lysin Hydrobromid; P6407	Sigma-Aldrich (USA)
SDS	BioRAD (USA)
Sodium pyruvat (100mM)	Gibco; Thermo Fisher Scientific (USA)
MEM NEAA (100x)	Gibco; Thermo Fisher Scientific (USA)
SYBR Safe DNA gel stain	Invitrogen (USA)
TEMED	Sigma-Aldrich (USA)

Tris ultrapure	PanReac AppliChem (USA)
Tween 20	Sigma-Aldrich (USA)
Média	
DMEM/F12 GIBCO® Dulbecco's Modified Eagle Medium	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific (USA)
DMEM	Lonza (Švýcarsko)
LB-Medium	Carl Roth (Německo)
Opti-MEM I Reduced-Serum Medium GIBCO	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific (USA)
S.O.C medium	Invitrogen (USA)
Séra	
BGS (Bovine Growth Serum)	HyClone (USA)
FGS (Fetal bovine serum)	HyClone (USA)
Antibiotika	
Penicilin/streptomycin	Lonza (Švýcarsko)
Puromycin dihydrochlorid	Sigma-Aldrich (USA)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (USA)
Ampicilin	Sigma-Aldrich (USA)
Buněčné linie	
One Shot® Stbl3™ Chemically Competent E. coli (STBL3)	Invitrogen (USA)
BL21	Agilent Technologies (USA)
HEK293 G2	Clontech (USA)
CAD 5	Poskytnuty: Charles Weissmann Department of Infectology, Scripps, Florida
CAD 5-LP1	Martin Panigaj; připraveny v naší laboratoři
CAD 5-LP2	Martin Panigaj; připraveny v naší laboratoři
CAD 5-LN _{mar}	Martin Panigaj; připraveny v naší laboratoři
CAD 5-NS	Martin Panigaj; připraveny v naší laboratoři
CAD 5-LMP	Martin Panigaj; připraveny v naší laboratoři
CAD 5-LN _{seb}	Sebastien Gadiou; připraveny v naší laboratoři
CAD 5 - RML	Tibor Moško; buňky s infekčním prionovým kmenem RML (Adrian Aguzzi; Institute of Neuropathology, University of Zurich); připraveny v naší laboratoři

Plasmidy/vektory

VSV-G

Clontech (USA)

LMP (LP1, LP2, NS, LN)

Martin Panigaj; připraveny
v naší laboratoři

Použité kity/assay

Cell Counting Kit-8 (CCK-8 assay)

DOJINDO (Japonsko)

GoTaq® G2 DNA Polymeraza

Promega (USA)

Pierce™ BCA Protein Assay Kit

Thermo Fisher Scientific (USA)

RevertAid First Strand cDNA synthesis kit

Thermo Fisher Scientific (USA)

RNAasy Mini Kit

QIAGEN (Německo)

S.N.A.P. MidiPrep kit

Ivotrogen(USA)

TaqMan® assay

Thermo Fisher Scientific (USA)

TurboDNA-free

Ambion/ Life Technologies (USA)

Protilátky

6D11 (Anti-PrP^C - N-konec; monoklonální IgG_{2a})

Biolegend (USA)

AH6 (Anti-PrP^C – C-konec; monoklonální IgG_{2a})

Roslin Resorse center (USA)

DAM (Sekundární; Donkey anti-Mouse)

Jackson ImmunoResearch (USA)

DC-2 (Anti-PrP^C- N-konec; polyklonální IgG)

Blood Transfusion Centre of
Slovenia, Ljubljana

GAM (Sekundární; Goat anti-Mouse)

Jackson ImmunoResearch (USA)

GAP-43 (Monoklonální IgG_{2a})

Sigma-Aldrich (USA)

Markery

2x RNA Loading Dye

Thermo Scientific (USA)

6x DNA Loading Dye

Thermo Scientific (USA)

DNA Lader Mix

Thermo Scientific (USA)

Page Ruler

Thermo Scientific (USA)

Další materiál

Nitroceuózová membrána 0.2µm

Bio-Rad (USA)

Rattler Platting beads 5mm

Zymo research (USA)

E-Plate L8

ACEA Biosciences, Inc. (USA)

4 Použité přístroje

Aparatura na elektroforézu	BioRad (USA)
BioSpectrometr	Eppendorf (Německo)
Bürkerova komůrka	Marienfeld (Německo)
Centrifuga MiniSpin plus	Eppendorf (Německo)
CO ₂ inkubátor	ESCO (USA)
Electrophoresis power supply ESP 400/500	Pharmacia (USA)
Fluorescenční mikroskop	Nicon (USA)
iCELLigence systém	ACEA Biosciences (USA)
Invertovaný mikroskop	Olympus IX70 (USA)
Laminární box	ESCO (USA)
Master cycler gradient	Eppendorf (Německo)
Mini-centrifuga GmCLab	Gilson (USA)
MiniLimi Bio – Imaging Systems	DNR (Izrael)
Shaking incubator	BioTek (USA)
Viktor ³ Multilabel Counter	PerkinElmer (USA)
Vodní lázeň Nuve bath nb5	Biotechlab (Bulharsko)
Vortex Genie 2	Scientific industrie (USA)

5 Metodika

5.1 Buněčné linie

5.1.1 Linie CAD 5

Buněčná linie CAD 5, byla vytvořena v několika krocích v sledu:

Cath.a → CAD → CAD 5

Cath.a buněčná linie byla založena z nádoru katecholaminergních buněk mozku transgenní myši, vzniklého za pomoci SV40 T antigenu s promotorem pro kryší tyrozin hydroxylátu (TH) (Suri et al. 1993). Z Cath.a linie byla selektován klon - linie CAD (Cath.a- differentiated), která stejně jako původní obsahuje biochemické znaky specifické pro neuronální buňky a aktivní TH, avšak CAD buňky mají navíc i morfologii podobnou neuronům a jsou schopné reverzibilně diferencovat po odebrání séra z media (Qi et al. 1997).

Zásadní odlišností mezi CAD a Cath.a liniemi je spontánní vymizení původního imortalizujícího onkogenu u dceřiné linie, jsou ale také větší, mají drobné výběžky, rostou více disperzně, než linie původní (Qi et al. 1997). CAD linie exprimují neuron-specifické znaky jako jsou synaptotagmin, GAP-43 (Growth Associated Protein 43), SNAP-25 (synaptosomal-associated protein - 25), β III-tubulin a naopak nedochází k expresi GFAP (Glial fibrillary acidic protein) (Suri et al. 1993; Qi et al. 1997; Li et al. 2005). Odvozený subklon linie CAD 5 je navíc schopen propagovat priony, a řadí se mezi malé množství buněk schopné akumulovat detekovatelné množství PrP^{Sc} (Mahal et al. 2007).

5.1.2 Infekční linie CAD 5

Infikované buňky CAD 5 byly připraveny v naší laboratoři pomocí infekčního kmenu prionu RML. K buňkám byl přidán do media 1% infikovaný myší mozkový homogenát, který byl v mediu dvacetkrát naředěn, výsledné množství homogenátu v mediu bylo 0,05%. Po nárůstu buněk v přítomnosti RML kmene prionu, bylo odebráno medium a byla provedena pasáž buněk. V průběhu šesti následných pasáží byl mozkový homogenát z media vyředěn a byla provedena kontrola úspěšné infekce buněk pomocí štěpení proteinázou K (PK). Zatímco PrP^C je PK zcela rozštěpen, při štěpení PrP^{Sc} vzniká 27-30kDa zbytek, který je možné detekovat pomocí western blotu (Pan et al. 1993).

5.1.3 Ko-transfekční linie

HEK293 G2	Adherentní balící linie pocházející z lidských embryonálních buněk ledvin
STBL3	Kompetentní bakterie Escherichia coli, určené pro přímé klonování do lentivirového expresního vektoru
BL21 Competent Cells	Kompetentní bakterie Escherichia coli, vhodné pro transformaci plasmidu a expresi proteinu

5.1.4 Linie se sníženou expresí PrP^C - LP1 a LP2

Linie LP1 a LP2 (Tabulka 5) odvozené z buněk CAD 5 mají sníženou expresi PrP^C pomocí RNA interference - small hairpin microRNA (shRNAmiR). Sekvence shRNA (Tabulka 3) byly zabudovány do lentivirového retro-vektoru LMP (MSCV/LTRmiR30-Pig), jehož součástí jsou také geny pro EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) a selekční marker puromycin. Tento vektor byl společně s VSV-G plasmidem, kódujícím balící protein viru vezikulární stomatidy, přidán do media balících buněk- HEK293 G2.

LP1 shRNAmiR (HP_285770)
TGCTGTTGACAGTGAGCGACCTATGTTCTGTACTTCTATTAGTGAAGCCACAGATGTAATAGAAGTACAGAAACATAGGGTGCCTACTGCC TCGGA
LP2 shRNAmiR (HP_288208)
TGCTGTTGACAGTGAGCGAGCAAAGGGTTCTACAACCAATAGTGAAGCCACAGATGTATTTGGTTGTAGAACCCTTTGCCGTCCTACTGCC TCGGA

Tabulka 3; sekvence shRNAmiR (dostupné z RNAi codex database). Červeně značené NK popisují komplementární části k sekvenci mRNA PRNP, zelené smyčku (loop) shRNA. Směr zápisu 5'→3'.

Po transfekci (příslušnými plasmidy) balících buněk byla buněčná suspenze centrifugována a supernatant, obsahující virové partikule, byl přidán k buňkám CAD 5. Linie LP1 a LP2 byly připraveny společně s kontrolními liniemi LMP (obsahuje prázdný vektor), NS a LN, které obsahují „scrambled“ shRNAmiR, nevazující se na mRNA prionového proteinu (Tabulka 4). Všechny tyto linie byly připraveny Martinem Panigajem (Panigaj et al. 2011b), pouze LN_{seb} dle shodného protokolu připravil Sebastien Gadiou.

Buněčné linie - kontrolní	Funkce shRNAmiR
CAD 5	WT
CAD 5 - LN _{seb} ; LN _{mar}	Nonsilencing shRNAmiR
CAD 5 - NS	Nonsilencing shRNAmiR
CAD 5 - LMP	Prázdný vektor

Tabulka 4; Použité kontrolní buněčné linie.

Buněčné linie – down-regulace	Funkce shRNAmiR
CAD 5 - LP1	Anti-Prnp shRNAmiR
CAD 5 - LP2	Anti-Prnp shRNAmiR

Tabulka 5; Použité buněčné linie se sníženou expresí PrP^C pomocí RNA interference.

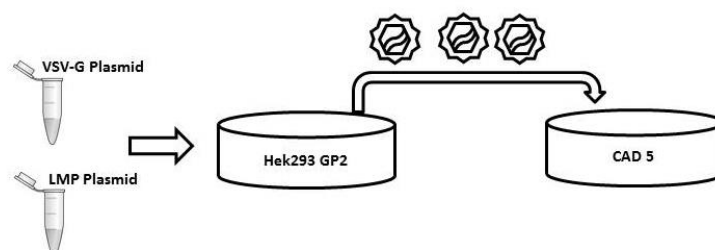
5.1.5 Příprava nových linií - LP1 a LP2

Příprava byla zopakována dle protokolu Martina Panigaje, který tyto linie připravil v rámci své disertační práce (Panigaj et al. 2011b).

Do kompetentních bakterií STBL3 byly pomocí heatshocku (42°C, 30s) transfekovány LMP plasmidy s vektorem obsahující silencing Anti-Prnp shRNAmiR. Do kontrolních linií byly stejným způsobem transfekovány LMP vektory s nonsilencing shRNAmiR - LN, NS a plasmid s prázdným LMP vektorem – bez shRNA. Shodný postup byl separátně použit pro bakterie BL21 a transfekci VSV-G plasmidu, obsahujícího povrchový glykoprotein viru. Připravené jednotlivé linie byly v mediu S.O.C. 2 hodiny třepány při 37°C, 150rpm.

Následně byly linie nasazeny na Petriho misky s agarem obsahujícím 50mg kanamycinu. Po nárůstu (24h) byly odebrány jednotlivé kolonie, které byly zaočkovány do suspenzního LB-media s kanamycinem. Po 24h byly z kolonií separovány plasmidy pomocí S.N.A.P. MidiPrep kitu, které byly uvolněny do dH₂O.

VSV-G plasmid společně s příslušným LMP plasmidem (LP1, LP2, LMP, NS, LN) byl v poměru 1:2 transfekován do HEK293-G2 balících buněk (Obrázek 3), stabilně exprimujících Gag a Pol, společně s lipofektaminem v OptiMeM mediu a s +10% FGS (Fetal Growth Serum). Druhý den bylo medium vyměněno za OptiMeM +10% BGS +1%P/S (penicilin/streptomycin) +MEM NEAA (Non Essential Amino Acids; 1mM) +1%pyruvát. Tři dny po transfekci bylo odebráno kultivační medium obsahující virové partikule od HEK293-G2 buněk a následně bylo pro odstranění kontaminací stočeno 400xg, 5min, 25°C. Supernatant s přidáním polybrenem (4μg/ml) byl přidán k buňkám CAD 5 v poměru 1:1 s OptiMem +10%BGS +1%P/S. Následně byly buňky centrifugovány 99min při 500xg, 37°C a kultivovány přes noc. Druhý den bylo médium vyměněno za OptiMem +10%BGS +1%P/S. Po 48h bylo možné pod mikroskopem detekovat GFP signál. Linie byly v průběhu dalších pěti dnů selektovány mediem s přidáním puromycinem (1.5μg/ml).



Obrázek 3; Transdukce CAD 5. LMP plasmid (LP1, LP2, LN, NS, LMP) byl společně s VSV-G plasmidem transfekován do balící linie HEK293 GP2. Po třech dnech bylo odebráno medium obsahující virové partikule z HEK293 GP2 a bylo přidáno k linii CAD 5.

5.1.6 Kultivace buněk

Buňky CAD 5 (WT) byly kultivovány v mediu Opti-MEM, do kterého bylo přidáno 100U/ml (P/S) a 10% neinaktivované BGS (Bovine Growth Serum). K buněčným liniím LP1, LP2, LMP, NS a LN byl do media, jako selekční marker, přidán puromycin o výsledné koncentraci 1.5μg/ml. Diferenciace byla indukována výměnou media za DMEM/F12 bez séra, pouze s 100U/ml P/S. Buňky byly pasážovány každý 3. – 4. den, v poměru 1:10. Na jednotlivé pokusy byly použity buňky mezi 2. až 4. pasáží. Buňky byly uchovávány v inkubačním boxu při teplotě 37°C a 5% CO₂. Do pokusů byly buňky počítány pomocí Bürkerovy komůrky.

5.2 Cell Counting Kit-8 (CCK-8- assay)

Buňky byly připraveny na jednotlivé 96-jamkové destičky, 1den/1 destička, 2000 buněk/jamka v Opti-MEM mediu. Destičky byly předem potaženy poly-D-lyzinem (50mg/ml) a opláchnuty dH₂O. Druhý den po nasazení bylo medium vyměněno za DMEM/F12, které indukovalo diferenciaci. Medium bylo měněno z poloviny každý den. Absorbance vzorků byla měřena při 450nm každý den po 2 hodinách inkubace s CCK-8 na destičkovém spektrofotometru Viktor. Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programu R.

5.3 iCELLigence systém

Do jednotlivých jamek bylo nasazeno 5000 buněk v mediu Opti-MEM. Medium bylo vyměněno druhý den za DMEM/F12 bez séra. V průběhu měření průběhu diferenciaci bylo medium měněno z jedné poloviny každý den.

5.4 Focení morfologie

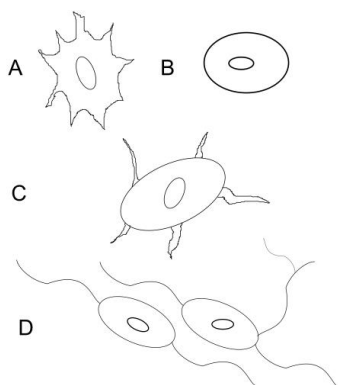
Buňky byly nasazeny na 24-jamkovou destičku, 4000 buněk/jamka v mediu Opti-MEM. Medium bylo druhý den vyměněno za DMEM/F12 medium bez séra a bylo z poloviny měněno každý den. Focení probíhalo v jednotlivé dny diferenciaci na světelném invertovaném mikroskopu Olympus IX70.

Fluorescenční značení buněk

Buňky byly nasazeny na sklíčko umístěné ve 24-jamkové destičce, 4000 buněk/jamka v mediu Opti-MEM. Medium bylo druhý den vyměněno za medium DMEM/F12 a bylo z poloviny vyměněno každý den. V příslušný den diferenciaci byly buňky fixovány 4 % paraformaldehydem přidaným do media. Jádra byla značena pomocí Fluoroshieldu s Dapi. Foceno na fluorescenčním mikroskopu Nikon.

Určování morfologie

Jednotlivé buňky byly rozděleny do 4 morfologických typů A, B, C, D, dle (Jindrova 2016), viz kap. 6.2.2, vyhodnocování bylo provedeno za pomoci programu Fiji ImageJ.



5.5 Western blot

Připravené pelety byly 30 minut lyzovány ve 100μl lyzačního pufru (2mM EDTA, 50mM TRIS-HCL, 10% glycerol, 1% SDS) do kterého byla přidána benzonáza (0.25 jednotek/μl) a Complete (0.25 objemu lyzačního pufru). Koncentrace proteinů byla určena pomocí BCA assay. Na jamku bylo naneseno příslušné množství proteinu za redukujících podmínek (100mM DTT). Proteiny byly separovány na 10% poly-acrylamidovém gelu pomocí SDS-PAGE a přeneseny na 0.2μm nitrocelulosoovou membránu. Protein PrP^C byl barven 2 hodiny primárními protilátkami vázajícími se na odlišné části proteinu. Použity byly AH6 (1:3000), DC-2 (1:15000), 6D11 (1:2000) v 1 % mléce. Protein GAP-43 byl 2 hodiny barven protilátkou GAP-43 (1:1000) v 1 % mléce. Na sekundární barvení byly použity protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou: DAM (1:2000) nebo GAM (1:2000), v 1 % mléce 1 hodinu. Pro vyvolání byl použit substrát pro alkalickou fosfatázu BCIP/NBT. Pro densitometrické vyhodnocení byl použit program Fiji ImageJ.

5.6 Reverzní transkripce (RT) + PCR

Pelety byly připraveny z ½ objemu sklizených buněk, rostoucích na kultivačních lahvích o velikosti 25cm², v jednotlivé dny diferenciacie (0, 1., 3., 5., 7.) a vzorky byly uchovány v -80°C. RNA z pelet byla izolována pomocí RNA kitu. Kontaminace DNA byla odstraněna turboDNA-free DNázou. Reverzní transkripce – přepis do DNA (Tabulka 6) byla provedena pomocí kitu Revertaid RT+ribolock, jako primery byly použité náhodné hexanukleotidy. Na reakci byly použity 4µg RNA. Kontrola úspěšnosti RT byla provedena metodou PCR (Tabulka 7) s GAPDH primery a cDNA. Produkty PCR byly separovány na 1% agarózovém gelu pomocí elektroforézy.

5.6.1 RT

Na reakci reverzní transkripce V=20µl bylo použito:

Reverzní transkripce		Parametry cyklů RT
1. krok		
11µl	Separovaná RNA	1. 5 min 65°C
1µl	Hexanukleotidy 0,2 µg/µl	2. Zchlazení na ledu
2. krok		Přidání směsi pro druhý krok
1µl	Reverzní transkriptáza: RevertAid RT (200 U/µl)	3. 1 hod 42°C
1µl	RiboLock RNazový inhibitor 20 U/µl	4. 5 min 70°C
2µl	10 mM dNTP Mix	6. Zachování při 4°C
4µl	5x Reakční pufr	
Doplňeno dH ₂ O		

Tabulka 6; Reverzní transkripce probíhala ve dvou krocích za přítomnosti uvedených reaktantů. RT byla připravovaná pomocí RevertAid RT Kit.

5.6.2 PCR

Na PCR reakci V=25µl bylo použito:

PCR		Parametry cyklů PCR
0,2µl	GoTaq G2 polymerázy 5 U/µl	1. 2 min 94°C
5µl	5x zelený reakční pufr	2. 15 s 94°C
0,5µl	Nukleotidy 10mM	3. 1 min 55°C
1µl	cDNA	4. 1 min 72°C
0,5µl	Primery - forward+reverse 10 µM	5. Opakování kroků 2-4 v 30 cyklech
Doplňeno dH ₂ O		6. Zachování při 4°C

Tabulka 7; cDNA byla pomocí PCR amplifikována pomocí GoTaq® DNA Polymerase. Primery, pro kontrolu exprese GAPDH, byly využity z kitu RevertAid RT a tvoří 496kb produkt.

5.6.3 qPCR

Jednotlivé reakce vzorků cDNA byly připraveny v triplikátech (Tabulka 8). qPCR probíhala s komerčně zhotovenými neznačenými primery pro *PRNP* a specifickými fluorescenčními probami TaqMan® MGB (minor groove binder) značícími 5'konec pro geny *PRNP* a *GAPDH*. Expresi *PRNP* byla vztahována na hladinu exprese *GAPDH*.

Na qPCR reakci V=20μl bylo použito:

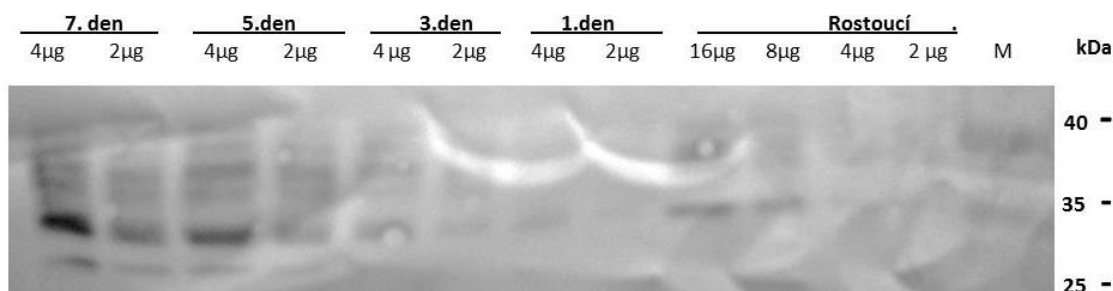
qPCR		Parametry cyklů qPCR		
1μl	cDNA	1.	2 min	50°C
1μl	Esej s primery+ proba	2.	10 min	90°C
10μl	Gene expression master mix	3.	15 s	90°C
8μl	dH ₂ O	4.	1 min	60°C
		5.	Opakování kroků 3-4 ve 40 cyklech	

Tabulka 8; qPCR připravovaná pomocí TaqMan® assay.

6 Výsledky

6.1.1 Exprese PrP^C v průběhu diferenciaci

Předpoklad možnosti vlivu exprese PrP^C na diferenciaci CAD 5 linie vychází z nárůstu množství PrP^C v jejím průběhu. Detekce PrP^C na western blotu (WB) u WT linie CAD 5 ukazuje, že se toto množství po indukci diferenciaci po sedmi dnech až 5 krát zvyšuje oproti rostoucím buňkám (Obrázek 4).

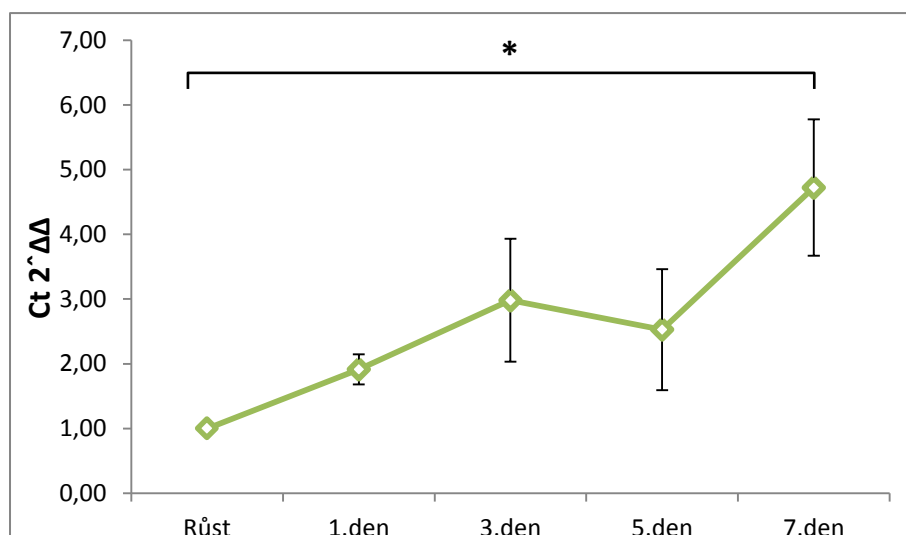


Obrázek 4; Exprese PrP^C během sedmidenní diferenciaci CAD 5 buněk. V průběhu diferenciaci se množství proteinu zvyšuje. Barveno AH-6, 6D11 a DAM.

6.1.2 Exprese *PRNP* genu

Metoda qPCR kvantitativně měří hodnoty Ct (threshold cycle), které ukazují, od kolikátého cyklu a jak běží vlastní polymerázová reakce spojená s amplifikací vzorku. Amplifikace je zaznamenána pomocí vyzářené fluorescence a toto množství fluorescence odpovídá obsahu cDNA (resp. mRNA) ve vzorku. Nastavuje se také tzv. base-line, která z výsledku odstraňuje fluorescenci vyzářenou pozadím. Exprese *PRNP* byla vztažena na expresi house-keeping genu GAPDH, která by měla být shodná mezi všemi liniemi a umožňuje tak jejich vzájemné porovnání (normalizaci).

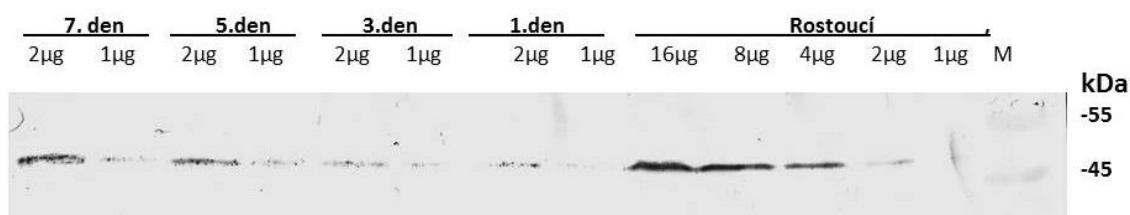
Zvyšující se množství buněčného prionového proteinu na WB korelovalo s mírou exprese genu *PRNP* na úrovni mRNA. Množství PrP^C u rostoucích buněk je až pětikrát nižší než u diferenciovaných po sedmi dnech od odebrání séra (Obrázek 5). Shodné či snížené množství mRNA pro PrP^C pátý den diferenciaci odpovídalo hladině exprese v den třetí. Tento trend nebyl detekován pomocí western blotu, kde množství proteinu kontinuálně vzrůstá, pomocí qPCR tento pokles byl zaznamenán v každém měření.



Obrázek 5; Expres *PRNP* genu u linie CAD 5. Během sedmidenní diferenciace byly v dny 1, 3, 5, a 7 sklizeny diferenciované buňky současně s rostoucími a ze vzniklých pelet byla izolována celková mRNA pomocí kitu. Ta byla následně pomocí PCR přepsána do cDNA. Tato cDNA byla s primery pro *GAPDH* či *PRNP* amplifikována metodou qPCR. Průměr z tří nezávislých měření \pm SEM. Statistické vyhodnocení párovým t-testem * $p=0,0403$; ***: $p<0.01$, **: $p<0.05$.

6.1.3 Expres neuron specifického proteinu GAP-43

Zda sérová deprivace stimuluje buňky CAD 5 k diferenciaci, bylo určováno podle dvou parametrů. Prvním parametrem byla změna morfologie a druhým změna v expresi proteinu specifického pro neurony. Po morfologické stránce (viz. kap. 6.2.2) během diferenciace nabývají CAD 5 buňky obdobu neuronální linie. Diferenciace byla také potvrzena zvýšenou expresí neuron-specifického markeru GAP-43 oproti rostoucím buňkám (Obrázek 6). Tento protein se vyskytuje na membráně axonu a neuritů, je důležitý pro formaci, maturaci a regeneraci synaptických kontaktů (Skene et al. 1986). U linie CAD 5 v průběhu sedmidenní diferenciace expres GAP-43 stoupá oproti rostoucím buňkám až osmkrát.



Obrázek 6; Expres GAP-43 u diferencujících CAD 5 linie. V průběhu sedmidenní diferenciace stoupá míra expres neuron specifického markeru až osmkrát. Barveno GAP-43 a DAM.

6.2 Porovnání linií s down-regulací PrP^C s kontrolními CAD 5

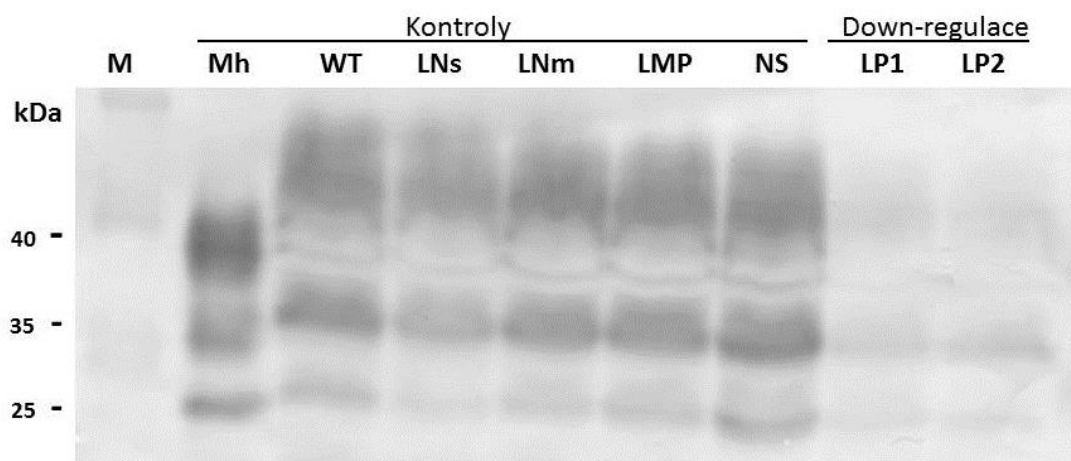
Cílem této části práce bylo porovnat linie se sníženou expresí PrP^C s liniemi kontrolními, které exprimují PrP^C a popsání případných rozdílů, při prokázání vlivu exprese PrP^C na diferenciaci. Buňky byly zkoumány z hlediska morfologie, byl porovnáván jejich tvar, rychlost růstu a viabilita.

6.2.1 Kontrola snížení exprese PrP^C

Prvním z kroků v porovnání buněk bylo ověření exprese PrP^C proteinu a potvrzení snížení jeho množství u down-regulovaných linií. Pro ověření snížení exprese byly využity dvě metody. Vizualizace množství PrP^C proteinu pomocí western blotu (Obrázek 7) a změření koncentrace mRNA v buňce pro tento protein pomocí qPCR (Obrázek 8). V obou případech bylo toto snížení potvrzeno.

6.2.1.1 Zobrazení snížení exprese metodou western blot

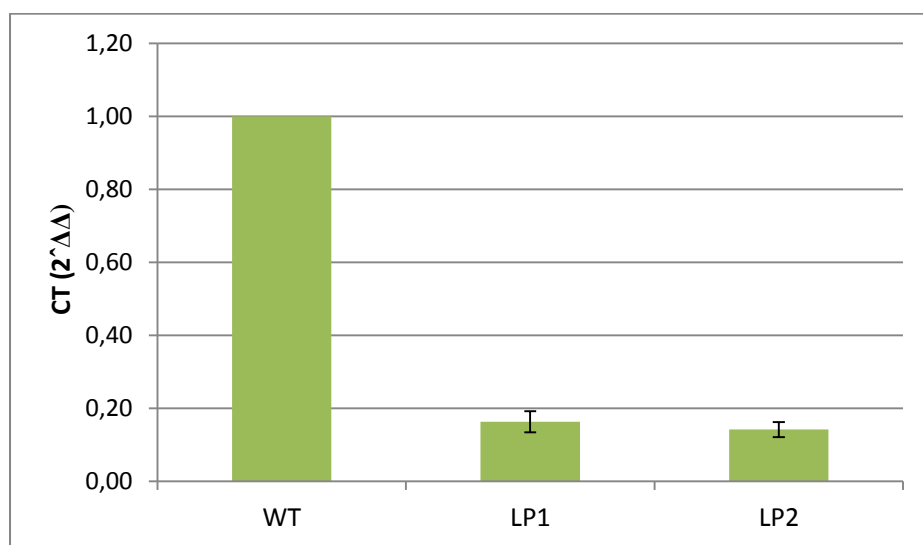
Pro zjištění účinnosti snížení exprese byl připraven western blot z lyzátu rostoucích buněk (Obrázek 7). Jako kontroly byly využity 0,5% myší mozkový homogenát, kontrolní linie LMP, LN_{seb}, LN_{mar}, NS a WT. Membrána byla barvena dvěma primárními protilátkami určenými na oba konce proteinu PrP^C. DC-2 byl barven N-konce a AH-6 byl barven C-konec PrP^C. Signál na membráně ukazuje signifikantní snížení množství PrP^C u LP1 a LP2 linií.



Obrázek 7; Kontrola přítomnosti proteinu PrP^C. Mozkový homogenát (Mh) 0,5%, LMP, NS, LN_{seb}, LN_{mar} a WT byly použity jako kontroly, LP1 a LP2 vykazují snížení exprese. Na gel bylo nanášeno 40mikrogramů proteinu na jamku, koncentrace gelu byla 10% a reakce probíhala za redukujících podmínek (1000mM DTT). Barveno AH-6, DC-2. Jako sekundární protilátka byla použita GAM.

6.2.1.2 Měření snížené exprese PRNP pomocí qPCR

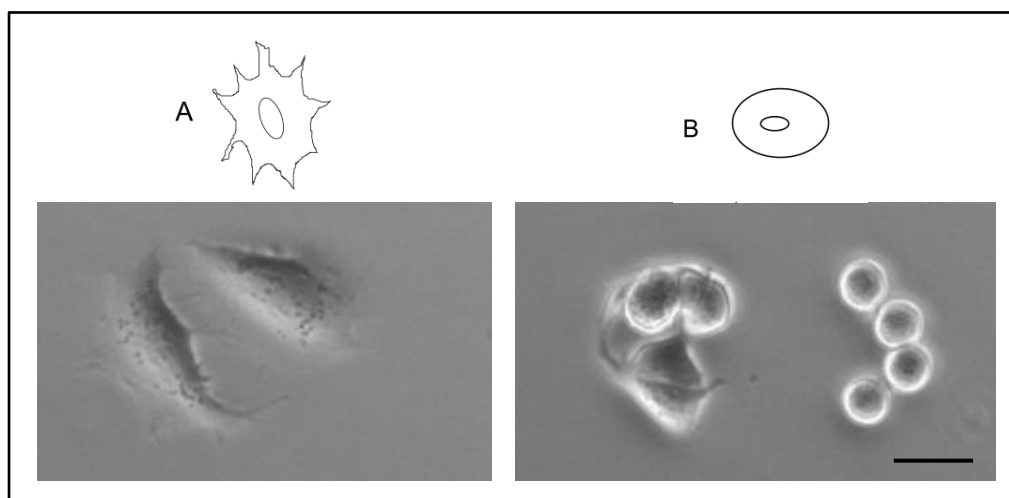
Snížení exprese bylo zároveň s WB ověřeno i na úrovni exprese mRNA genu *PRNP* (Obrázek 8). Výsledky ukazují, že u linií LP1 a LP2 byla exprese PrP^C snížena téměř 7x, oproti WT linii CAD 5.



Obrázek 8; Exprese *Prnp* v nediferenciováných CAD 5 buňkách normalizovaná k GAPDH. U linií LP1 a LP2 je exprese PrP^C snížena až 7x. Naměřené hodnoty Ct (threshold cycle) počítány s Auto-Baseline a Auto-Treshold. Reprezentativní obrázek z dvou nezávislých měření ±SEM.

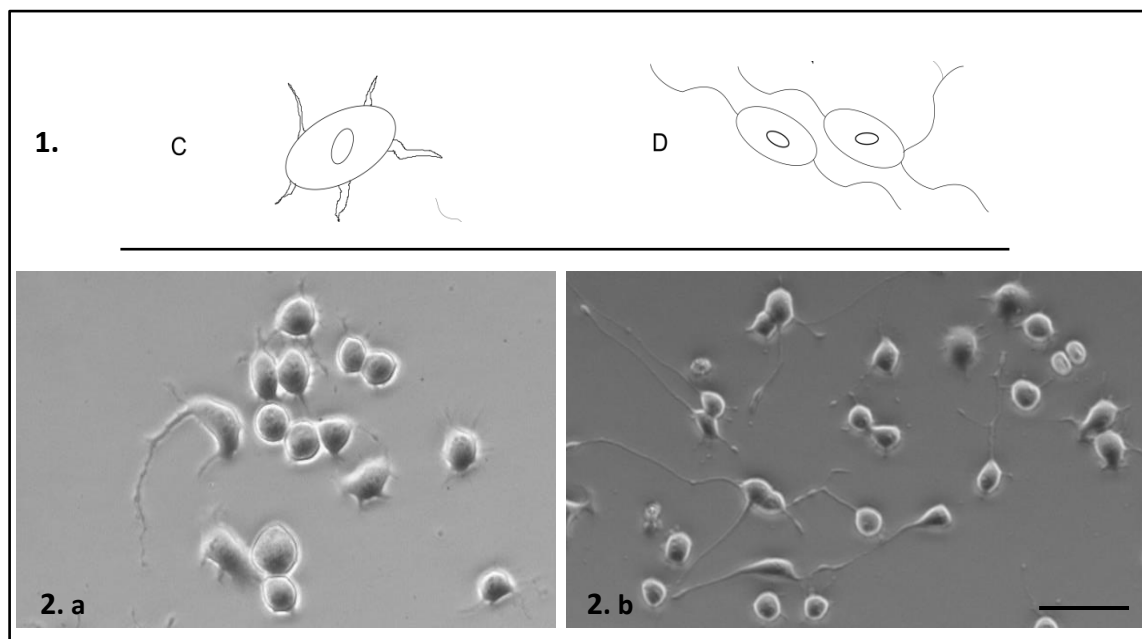
6.2.2 Morfologie

V průběhu diferenciaci mění CAD 5 buňky svou morfologii. V rostoucí kultuře v přítomnosti séra mají buňky morfologii především velmi adherentní/plochou k povrchu (Obrázek 9 - A), či mohou být kulaté, které jsou částečně adherované, dělí se nebo umírající (Obrázek 9 - B). Buňky v proliferační fázi se rozdělí v průběhu jednou za 24h. Rostou především ve skupinách a jsou schopné se přerůstat. Samostatné buňky s nedostatkem buněčných kontaktů v kultuře většinou umírají.



Obrázek 9; Rostoucí kultura WT linie CAD 5 obsahuje dva morfologické typy – A-typ; buňky silně adherované k povrchu s rozprostřenou cytoplasmou a B-typ - buňky kulaté. 10x zvětšeno, měřítko 12μm.

Po odebrání séra z media dochází ke změně morfologie u většiny buněk – vznikají dva další morfologické typy C a D, které tvoří různě dlouhé výběžky (Obrázek 10 – 1.). Po 24h od odebrání séra z media je možné pozorovat vznikající výběžky z membrány buněk CAD 5 (Obrázek 10 – 2. a), po 48h některé z buněk tvoří dlouhé výběžky, které propojují buňky nebo dendrity mezi sebou (Obrázek 10 – 2. b). Po čtyřech dnech diferenciaci v kultuře převládají hlavně typy C a D, část buněk odpovídá morfologickému typu A a jen malé množství buněk odpovídá kulatým (především apoptotickým) buňkám, typu B.

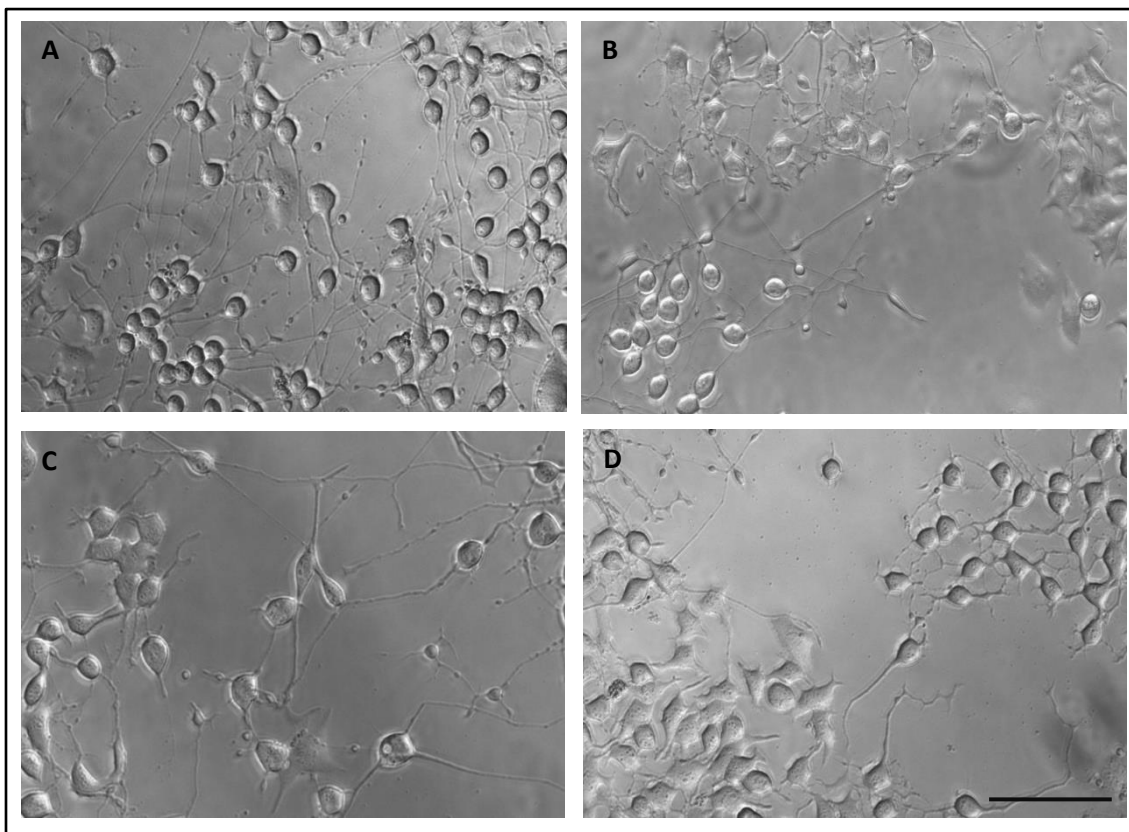


Obrázek 10; Morfologie diferencujících CAD 5 buněk za nepřítomnosti séra. Obrázek 1.; ukazuje dva morfologické typy diferencovaných buněk, C-typ s kratšími výběžky a D-typ s jedním dlouhým nebo více dlouhými výběžky. Obrázek 2. a; diferencující C-typ buněk CAD 5 po 24h bez séra. Diferencující buňky 2. b jsou 48h v nepřítomnosti séra a vykazují morfologii D-typu. 10x zvětšeno, měřítko 50 μ m.

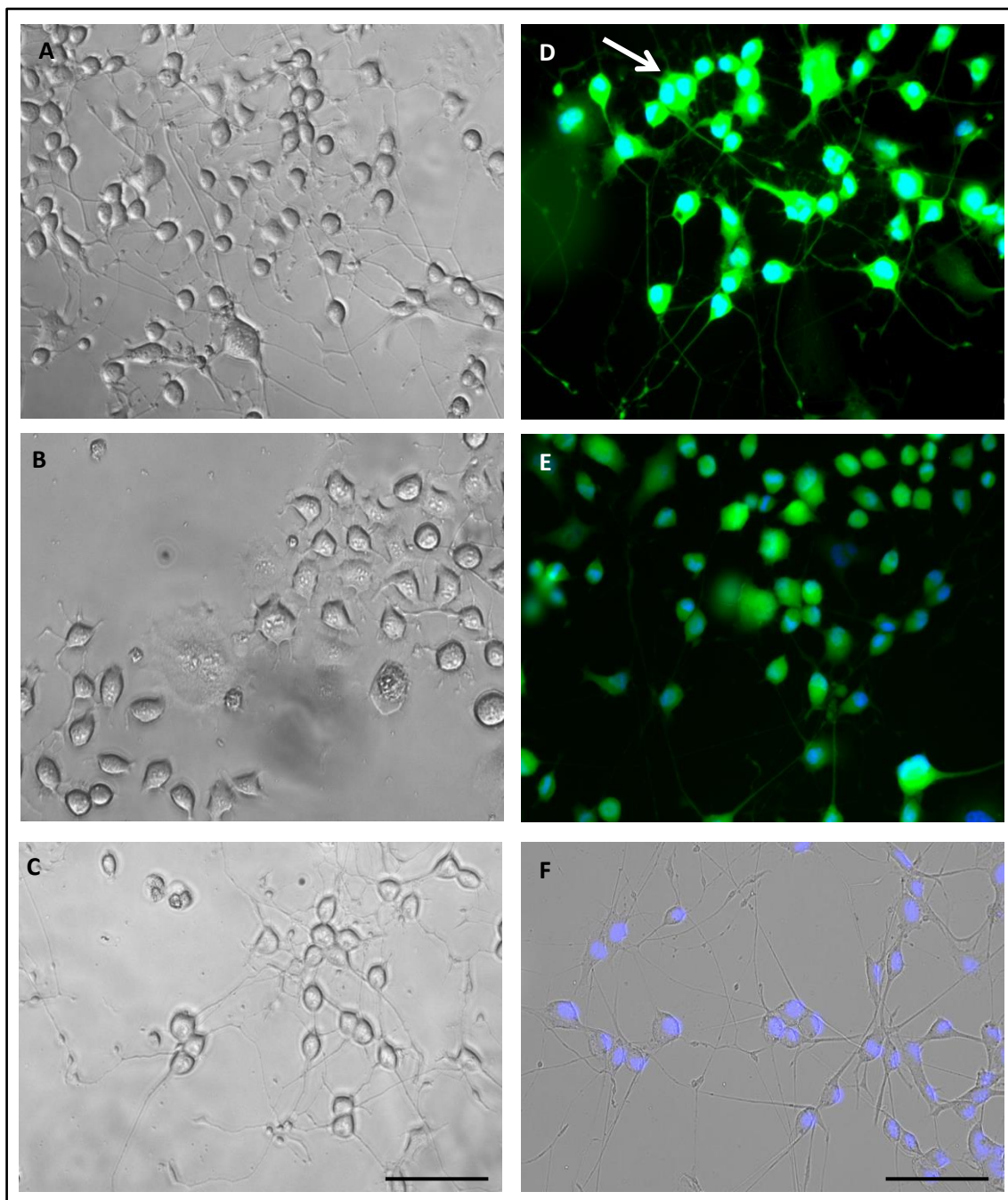
6.2.2.1 Morfologie u linií se sníženou expresí LP1 a LP2

Průběh růstu a diferenciaci LP1 linie byla morfologicky shodná jako u WT linie. Kontrolní linie LN_{seb}, LN_{mar}, NS, LMP (Obrázek 11) diferenciovaly shodně s WT linií, po 4 dnech se v kultuře vyskytovaly především diferencované typy C a D společně s typem A – velmi adherentními buňkami.

LP1 byly morfologicky shodné s WT, oproti tomu LP2 linie (Obrázek 12) vykazovala po 48h a 72h nižší množství D-typů diferencovaných buněk a spíše se buňky morfologicky podobaly typu C, tedy diferencovaným buňkám s krátkými výběžky. Růst a diferenciaci LP2 buněk se značně odlišoval nejen od kontrolních linií, ale také od LP1 linie. LP1 a LP2 linie nebylo možné z morfologického hlediska porovnat s WT linií CAD 5, s jinými kontrolami nebo mezi sebou.



Obrázek 11; Diferenciované kontrolní linie LMP (A), NS (B), LN_{mar} (C), LN_{seb} (D), foceno 4. den diferenciace. Linie tvoří po čtyřech dnech obdobnou morfologii WT linie - protáhlé buňky s dlouhými výběžky, buňky s kratšími výběžky, propojující se společně v hustou síť, a buňky velmi adherované. Zvětšeno 10x, měřítko 200μm.



Obrázek 12; Porovnání diferenciace u LP1 (A, D), LP2 (B, E) a WT (C, F) linie. Kontrolní linie WT a LP1 (A, D) tvoří od 4. dne diferenciace hustou síť propojených neuronálních buněk. LP2 (B, E) linie tvoří dlouhé výběžky v menším množství, naopak se tvoří krátké výběžky, propojující jednotlivé buňky mezi sebou. Šipka v obrázku D (diferenciované LP1 buňky) ukazuje na často pozorované dvou či více jaderné diferenciované buňky, které se vyskytují u všech immortalizovaných linií CAD 5. A, B, C – 10x zvětšeno; měřítko 200 μ m, D, E, F 20x zvětšeno měřítko 100 μ m, jádra barvena DAPI, LP1, LP2 exprimují EGFP.

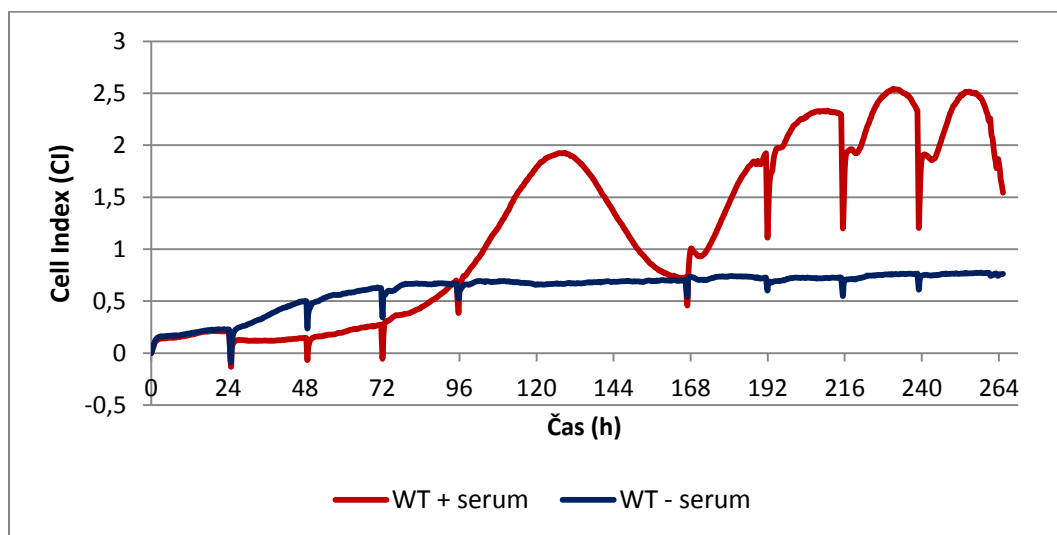
6.2.3 Měření schopnosti diferenciaci LP1 a LP2 pomocí systému iCELLigence

Během čtrnáctidenní diferenciaci byly pomocí iCELLigence systému měřeny změny hodnot impedance, popisující odpor ve střídavém proudu. Impedance se mění v závislosti na růstu buněk a jejich adhezi na povrchu mikroelektrod, které se nacházejí na dně kultivačních destiček. Impedance byla snímána každých 15min a zaznamenávána jako hodnoty cell index (CI). Systém umožňuje sledování růstu buněk u jednoho vzorku, bez jakéhokoliv zásahu krom výměny média.

Růst CAD 5 buněk (Obrázek 13) byl za přítomnosti a nepřítomnosti séra sledován po dobu 10 dnů. Medium bylo měněno každý den, vyjma dvou víkendových dnů (120. - 165. h). Na růstové křivce grafu se každodenní výměna poloviny media projevuje prudkým poklesem CI. Tento pokles nejspíše vzniká odlišnou teplotou mikroelektrod, která způsobuje změnu v odporu/impedanci.

V prvních pěti dnech dochází za přítomnosti séra k exponenciálnímu růstu buněk, naopak u buněk bez séra dochází po pěti dnech (96. - 120. h) k ustálení CI – zastavení dělení, buňky v tento okamžik jsou adherované s výběžky a většina z nich se nachází v diferenciovaném stadiu. Jejich buněčný index je poté konstantní po celý druhý týden, což odpovídá nedělící se kultuře.

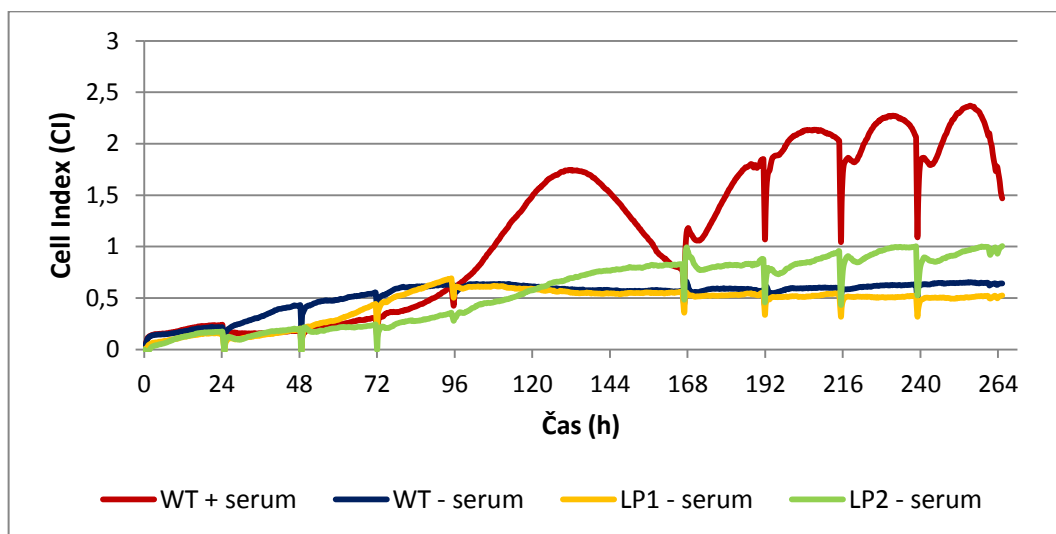
V průběhu dvou dnů bez výměny média (120. h – 168. h) rostoucí buňky kultivované se sérem umírají, a to z důvodu nedostatku živin. V druhém týdnu (od 168h) jsou buňky přerostlé, nemají již prostor pro dělení, zůstávají tak v plató fázi svého růstu. Během výměny media dochází k odběru mrtvých buněk a vzniku prostoru pro nové buňky, kultura tak může opět dočasně růst.



Obrázek 13; Průběh 14-ti denní diferenciaci CAD 5 linie. Pozitivní rostoucí kontrola - WT buňky za přítomnosti séra v mediu mají kontinuální růst, snížení hodnot CI mezi 120 až 168 hodinou vzniká během dvoudenní přestávky ve výměně media. Diferencující WT buňky v sérové deprivaci do 4. – 5. dne diferenciuji a ukončují buněčné dělení. Měřeno pomocí iCELLigence systému. Reprezentativní obrázek z 3 nezávislých měření.

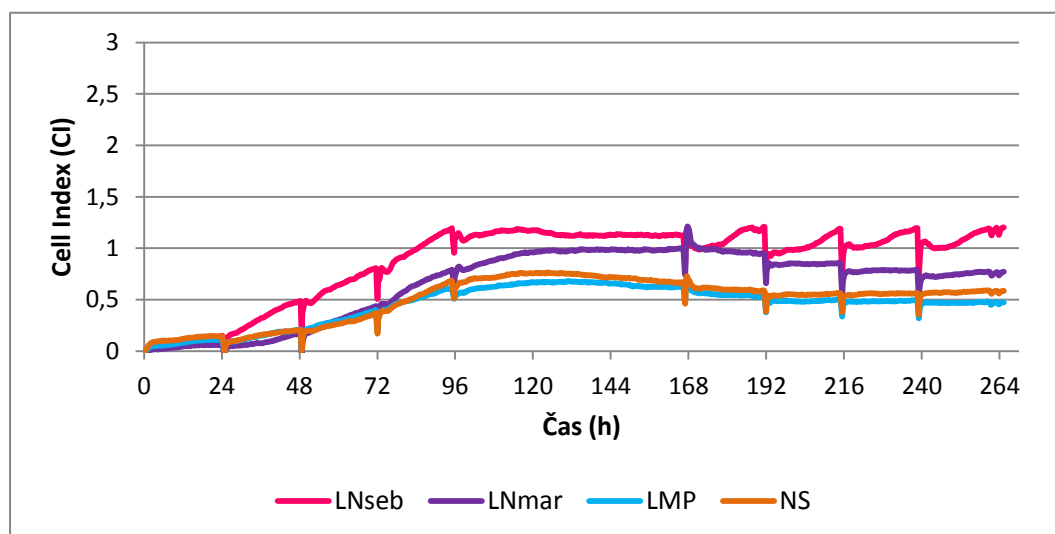
Měření CI diferenciaci LP1 a LP2 linií (Obrázek 14) ukázalo na odlišnost v průběhu růstu/diferenciaci mezi nimi. Zatímco linie LP1 odpovídala WT linii během diferenciaci, linie LP2 vykazovala hodnoty CI vyšší. Ačkoliv došlo k zastavení růstu oproti rostoucí kontrole, počátek diferenciaci byl významně opožděn a došlo k většímu nárůstu buněk, než u LP1 buněk a WT.

Zastavení nárůstu hodnoty CI a k tomu odpovídající zastavení růstu a diferenciovaný stav LP2 buněk bylo opožděno o přibližně 48h. LP1 a LP2 buňky vykazují rozdílné růstové a diferenciační schopnosti a není proto možné mezi sebou v tomto ohledu porovnávat.

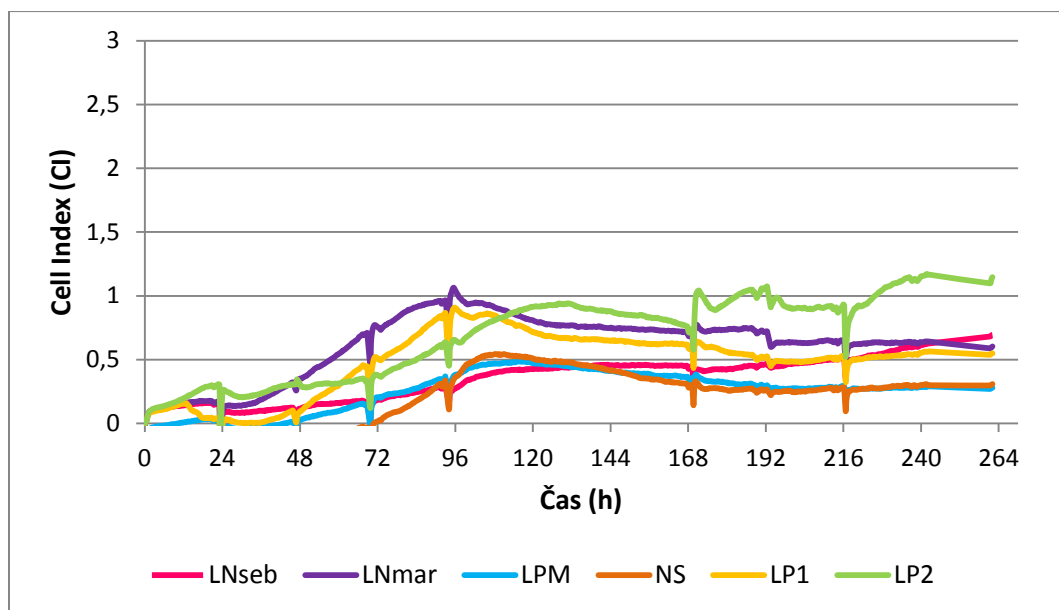


Obrázek 14; Porovnání diferencujících WT buněk s liniemi LP1 a LP2 pomocí iCELLigence. Jako pozitivní kontrola diferenciacce byly použity WT buňky rostoucí za přítomnosti séra. LP1 a WT buňky čtvrtý den přestávají růst a zůstávají diferenciovaném stavu. LP2 buňky rostou déle za nepřítomnosti séra, jejich diferenciacce je zpomalena oproti WT a LP1 liniím. Reprezentativní obrázek z 3 nezávislých měření.

Porovnání ostatních kontrolních buněk (Obrázek 15) ukázalo, že se linie mezi sebou částečně odlišují v průběhu diferenciacce. Především LN_{mar} a LN_{seb}, shodující se ve nonsilencing shRNAiR, jsou rozdílné od linií s prázdným vektorem LMP a NS linií, která v genomu nese též nonsilencing shRNAiR, avšak s odlišnou sekvencí od LN linií. Tyto linie zastavují růst okolo čtvrtého dne diferenciacce, shodně s WT. Přesto, že tyto linie nejsou homologní, je patrný rozdíl mezi diferenciací LP2 a všemi ostatními kontrolními liniemi, především mezi LP2 a LMP s NS (Obrázek 16). LP2 linie oproti všem má od 168h vždy vyšší hodnoty CI, patrně tedy buňky déle rostly a začaly diferenciovat později.



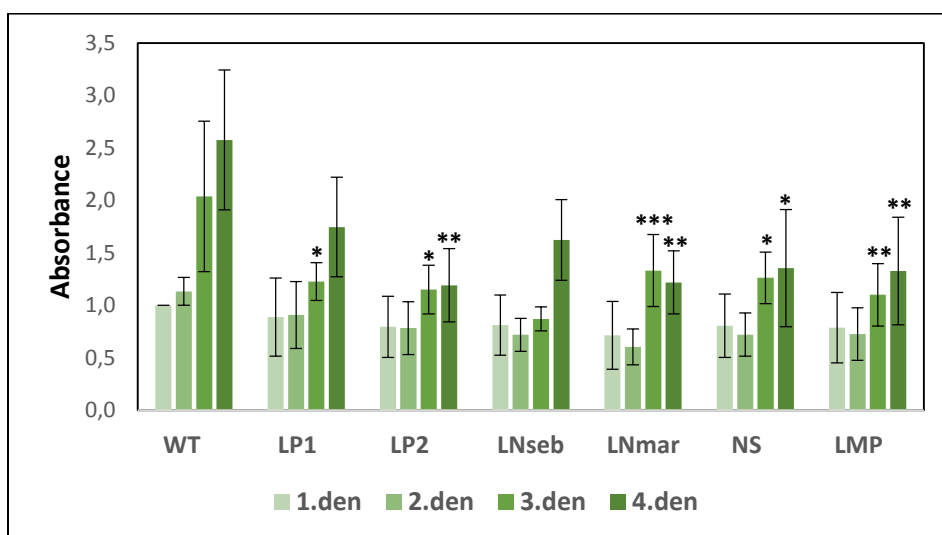
Obrázek 15; Kontrolní linie v průběhu diferenciacce měřená pomocí iCELLigence systému. Linie LMP a NS mají stejný průběh diferenciacce, liší se LN_{seb} a LN_{mar}. Reprezentativní obrázek z 3 nezávislých měření.



Obrázek 16; Porovnání LP1 a LP2 linií s kontrolními liniemi. Kontrolní linie mají nejednotný průběh, který je pravděpodobně dán částečně odlišným množstvím nasazených buněk do měření či schopností proliferovat. Buňky LP2 oproti ostatním kontrolám a LP1 linii ukončují svůj růst později. Reprezentativní obrázek z 3 nezávislých měření.

6.2.4 Viabilita linií

Principem tohoto kolometrického měření je změna absorbance media vznikající aktivitou živých buněk, která odpovídá jejich množství a viabilitě. K buňkám se do media přidává tetrazoliová sůl (WST-8), která je v živých buňkách redukována pomocí dehydrogenáz. Tato redukce je provázána změnou v zabarvení media (formazan dye) a odlišnou absorbancí, odpovídající množství živých buněk. Během prvních dvou dnů diferenciaci se absorbance/viabilita napříč liniemi neliší (Obrázek 17). Mezi hodnotami třetí a čtvrtý den je rozptyl hodnot vyšší, vznikají zde signifikantní rozdíly mezi WT a transdukovánými liniemi.



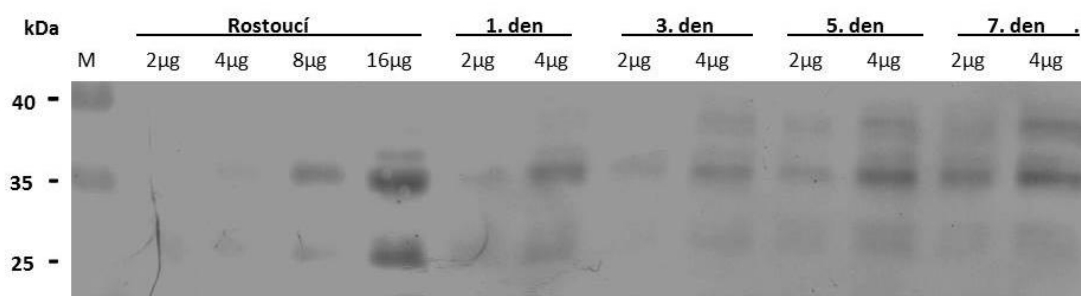
Obrázek 17; Viabilita v průběhu čtyřdenní diferenciaci. Pro toto měření byly připraveny společně čtyři 96-jamkové destičky, u kterých byla pomocí CCK-8 měřena viabilita v prvních čtyřech dnech diferenciaci. Uvedené hodnoty jsou ze dvou nezávislých opakování měření ve čtyřplikátech. Hodnoty byly vztaženy na hodnoty WT v první den měření (Průměr±SEM). Statistické vyhodnocení testem ANOVA; ****p: 0.001 ***p: 0.01, **p: 0.05.

6.3 Vliv infekce RML kmenu prionu na buněčnou diferenciaci CAD 5

V průběhu prionových onemocnění dochází ke konverzi běžné formy PrP^C na patologickou PrP^{Sc}, která je s onemocněním ve většině případů spojená. Co vede k toxickému účinku akumulovaných proteinů a jakým způsobem dochází k poškození mozkové tkáně, zůstává nejasné. Jednou z možných teorií je Loss-of-function hypotéza, které předpokládá, že PrP^C zastává určitou roli ve fyziologických procesech a jeho ztráta vede k vzniku prionového onemocnění (Hetz et al. 2003). V této části se práce věnuje vlivu infekčního prionového kmenu scrapie - RML na buněčnou diferenciaci CAD 5 linie.

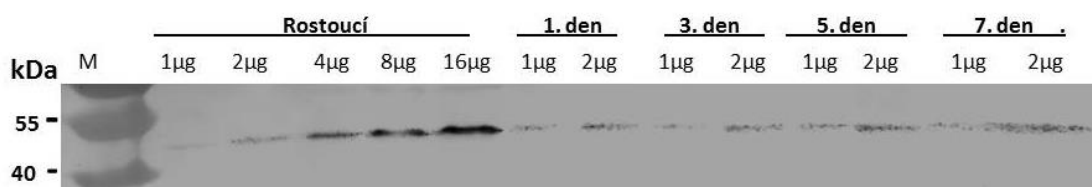
6.3.1 Diferenciace u RML infikované linie

Během sedmidenní diferenciace se množství PrP^C u buněk CAD 5 infikovaných RML zvyšuje (Obrázek 18). Tyto výsledky shodně korelují se vzrůstající expresí v průběhu diferenciace u neinfekční linie.



Obrázek 18; Expresa PrP^C během sedmidenní diferenciace RML kmenem infikovaných CAD 5 buněk. Vzorky byly odebírány z kultivační nádoby s plochou 25cm² v 1., 3., 5. a 7. den diferenciace, společně s rostoucí kontrolou. Na gel bylo nanášeno množství proteinu o uvedené koncentraci na jamku v ředící řadě, koncentrace gelu byla 10% a reakce probíhala za redukcujících podmínek. Barveno AH-6, 6D11 a DAM.

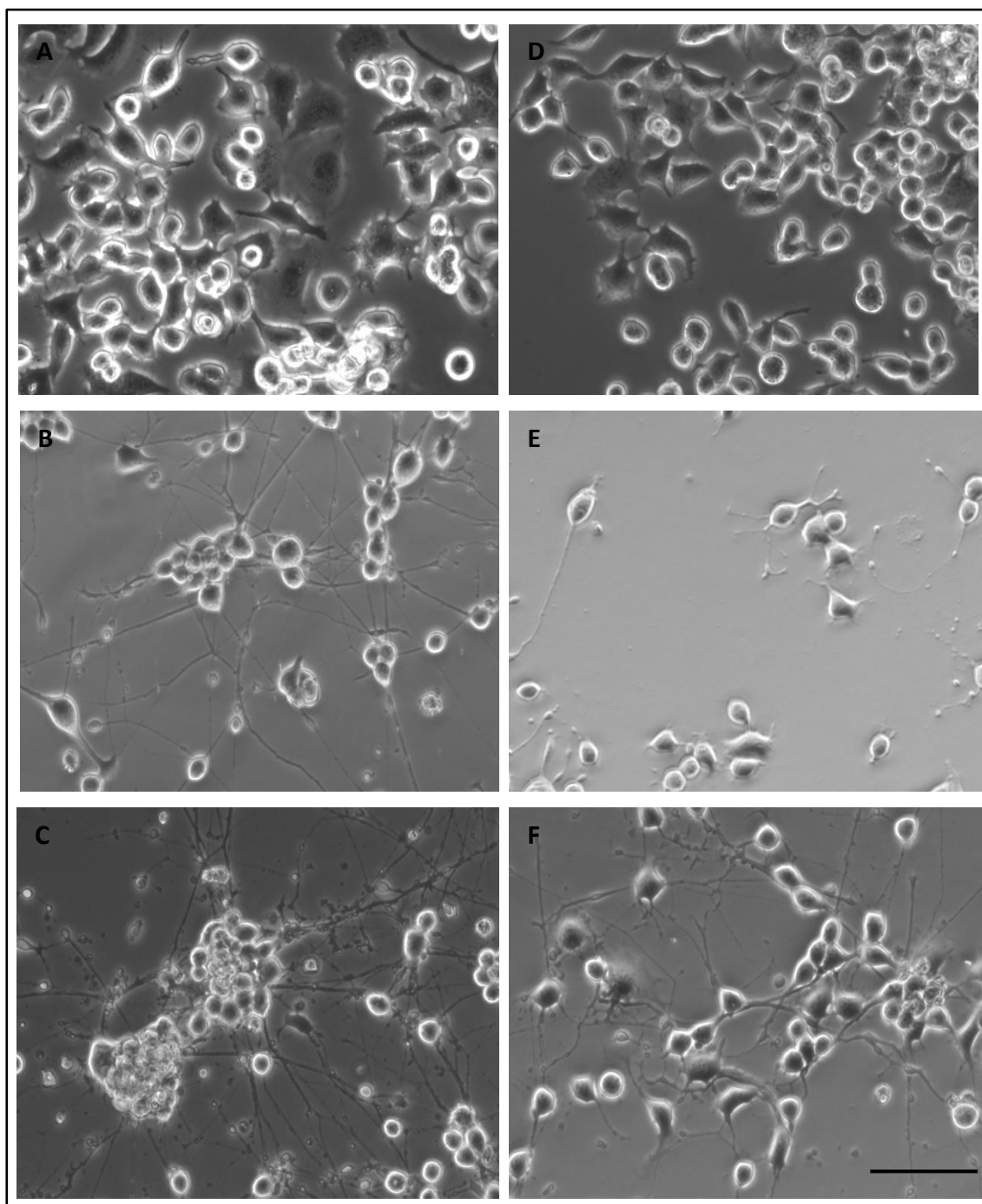
Stupeň diferenciace byl jako u zdravé linie ověřen morfologicky (viz. kap. 6.3.2) a měřením množství GAP-43. Expresa neuron-specifického markeru GAP-43 se shodně jako u zdravé CAD 5 linie zvyšuje v průběhu diferenciace (Obrázek 19). Množství proteinu odpovídá zdravé linii.



Obrázek 19; Zvyšující se exprese GAP-43 u diferencující RML kmenem infikovaných CAD 5 buněk v průběhu sedmi dnů. Barveno GAP-43 a DAM.

6.3.2 Morfologie

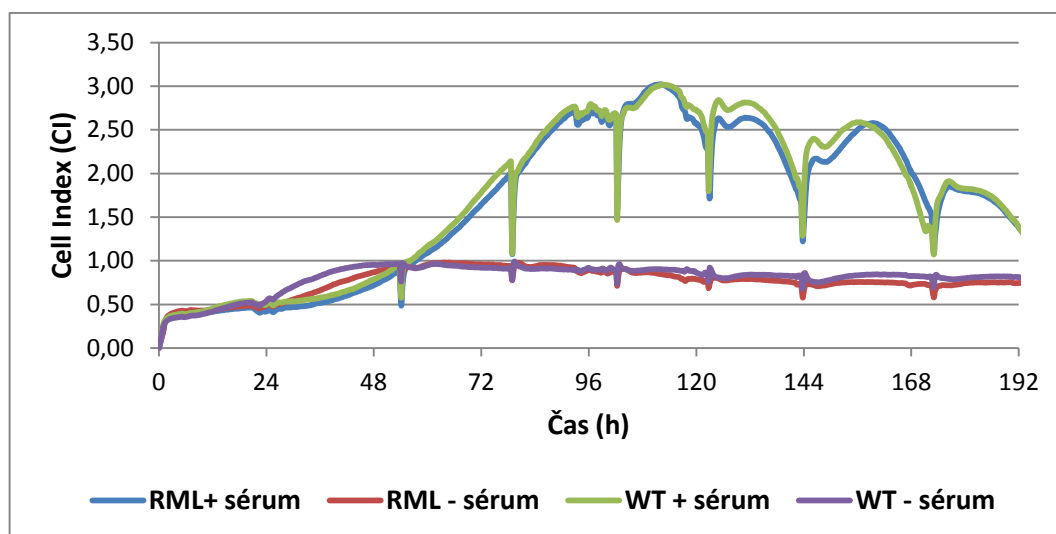
Buňky byly dle stejného klíče jako v kapitole 6.2.2, rozděleny do 4 morfologických typů A, B, C, D. Rostoucí linie zdravých a infikovaných buněk vykazovaly obdobnou morfologii, největší množství buněk v růstové fázi byly typy A nebo B (Obrázek 20). Pátý den diferenciaci zdravá CAD 5 linie (Obrázek 20 - B) vykazovala v slepém pokusu vyšší množství diferenciovaných buněk s dlouhými výběžky (typ D) než infikovaná linie (Obrázek 20 - E). Sedmý den se v obou kulturách nacházel především typ D, avšak zdravá linie (Obrázek 20 - C) obsahovala více apoptotických tělísek (Obrázek 20 - F).



Obrázek 20; Porovnání diferenciaci zdravé CAD 5 – WT linie (A – rostoucí; B – 5. den diferenciaci; C – 7. den diferenciaci) s infikovanou linií CAD 5 – RML (D – rostoucí; E – 5. den diferenciaci; F – 7. den diferenciaci). Rostoucí linie jsou morfologicky obdobné. Zdravá linie (B) 5. den diferenciaci obsahuje více buněk s dlouhými výběžky než infikovaná (E). Sedmý den diferenciaci buňky mají stejnou morfologii, u WT linie se nachází více apoptotických buněk. Zvětšeno 10x, měřítko 100 μ m.

6.3.3 Měření schopnosti diferenciaci infikované linie pomocí systému iCELLigence

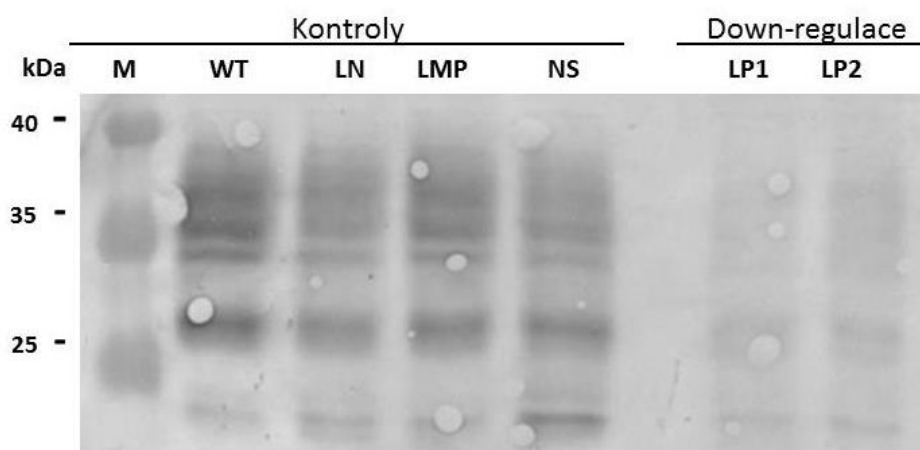
Detekovaná odlišná morfologie pátý den diferenciaci dala předpoklad možnosti rozdílného průběhu diferenciaci. Avšak při měření pomocí iCELLigence systému nebyl tento rozdíl detekován (Obrázek 21). Růstová i diferenciaci křivka byla u linií shodná.



Obrázek 21; Porovnání růstu a diferenciaci zdravých (WT) CAD 5 buněk s RML kmenem infikovanými buňkami CAD 5 (RML) metodou iCELLigence. V průběhu destidenního měření růstu (WT/RML linie + sérum) a diferenciaci (WT/RML linie – sérum) se zdravé buňky (WT) od infikovaných (RML) signifikantně neliší. Reprezentativní obrázek z tří nezávislých měření.

6.4 Příprava nové down-regulované linie LP1 a LP2 a srovnání s předchozími

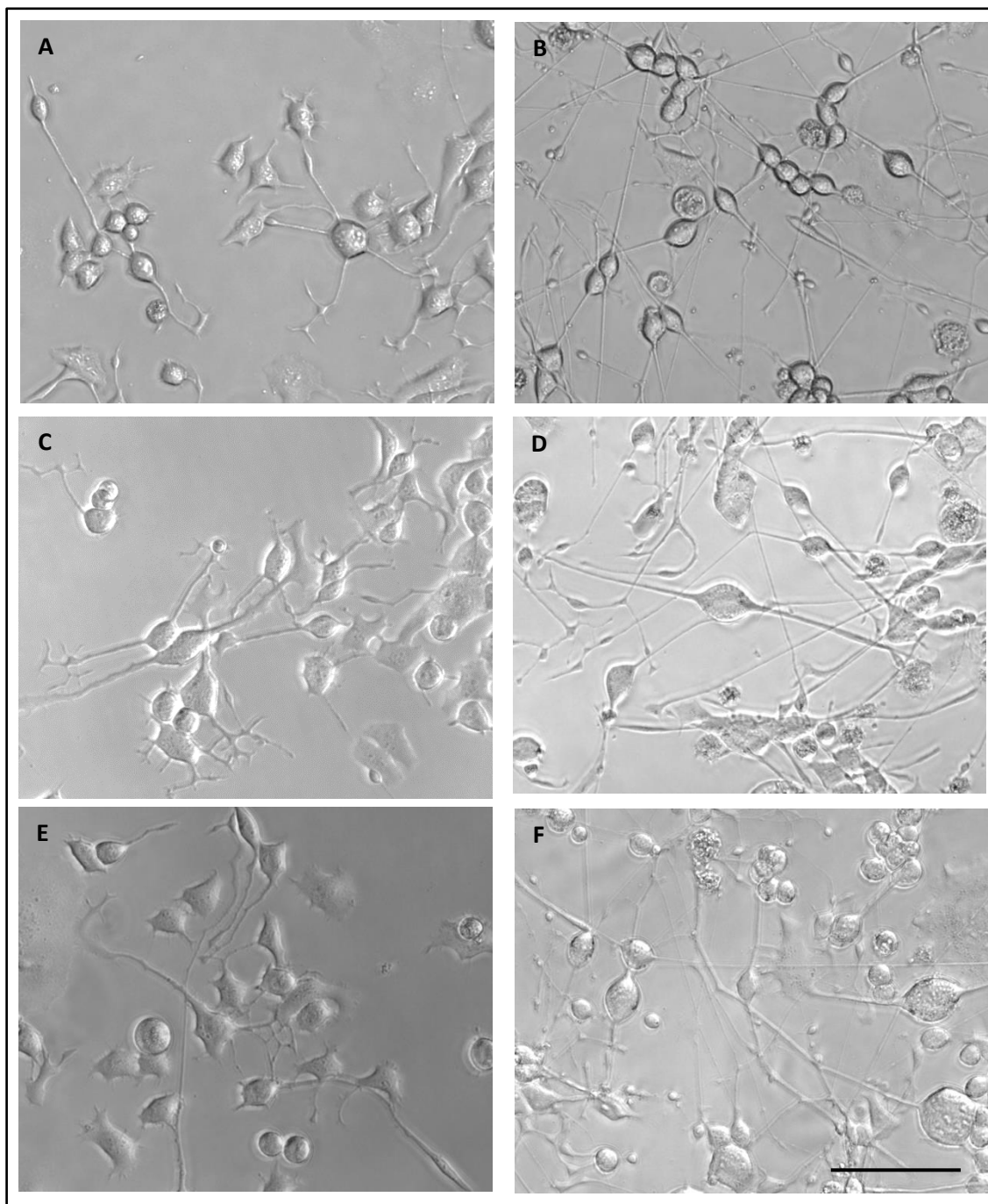
Odlišná morfologie a průběh diferenciaci u transdukované LP2 linie naznačila nevhodnost tohoto modelu pro studium míry vlivu exprese PrP^C na buňku. Jedním z pravděpodobných důvodů vzniku variability je příprava linií pomocí lentivirového vektoru. Během transdukce dochází k vložení odlišného množství transgenu do buněk a integrace do genomu je náhodná (Vigna a Naldini 2000). Při transdukci mohou vznikat lokální změny v chromatinové struktuře a v aktivitě v závislosti na místě a množství integrace transgenu. V případě LP2 linie mohlo dojít k integraci do nevhodného místa, či naopak sekvence shRNA pro LP2 ovlivňuje kromě translace mRNA pro PrP^C také mRNA pro jiný protein. Pro ověření, která z těchto možností je platná, byly připraveny nové linie LP1 a LP2 dle původního protokolu (Panigaj et al. 2011b). Snížení exprese bylo potvrzeno pomocí western blotu (Obrázek 22).



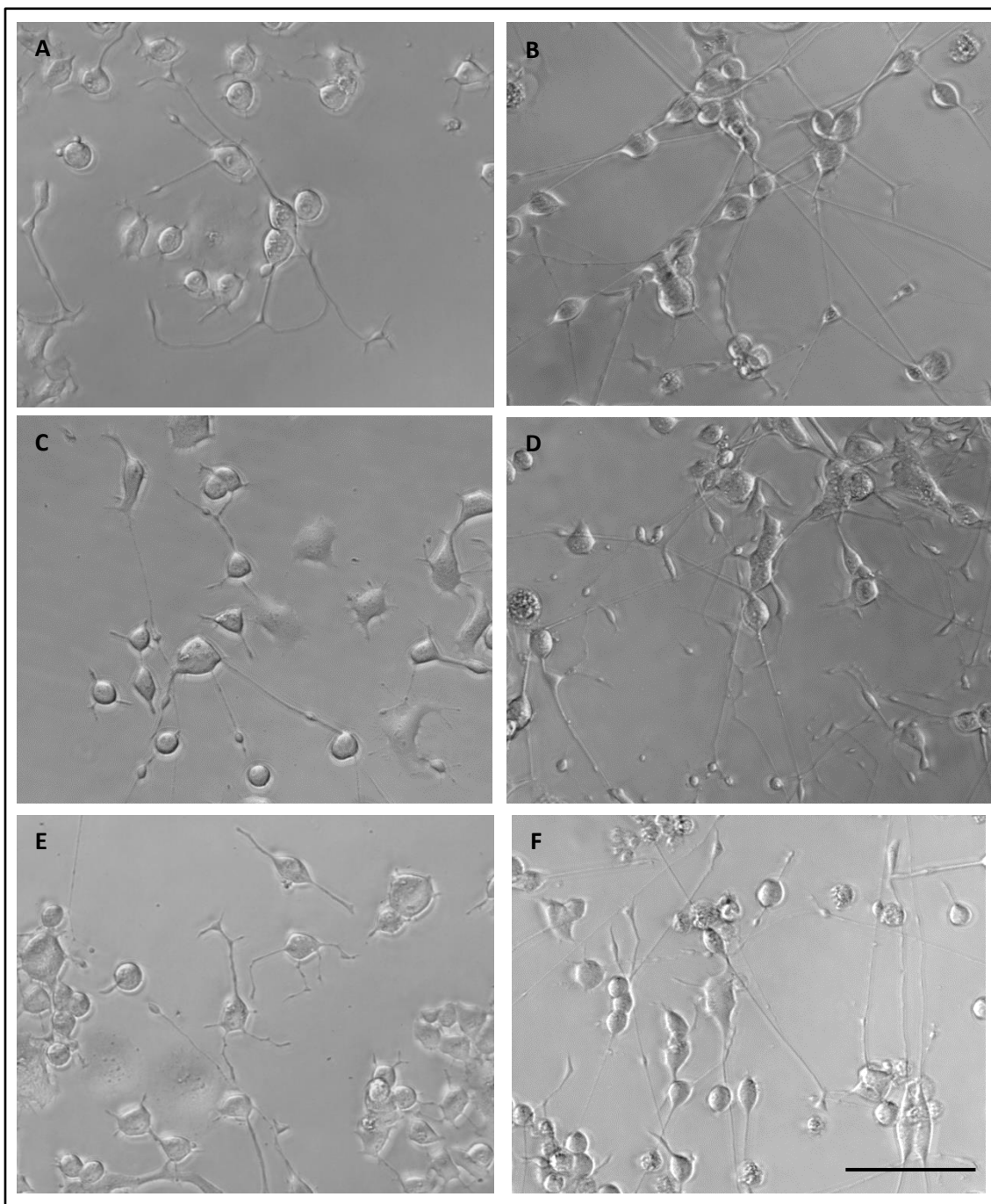
Obrázek 22; Kontrola snížení exprese u nově připravených linií LP1 a LP2. Na gel bylo nanášeno 40µg proteinu na jamku, koncentrace gelu byla 10% a reakce probíhala za redukcujících podmínek. Western blot potvrzuje snížení exprese PrP^C u nově připravených linií LP1 a LP2. Barveno AH6, 6D11 a DAM. M=marker.

6.4.1 Morfologie

Nově připravené linie byly kultivovány v nepřítomnosti séra a v jednotlivé dny diferenciaci byly pořízeny fotografie (Obrázek 23; Obrázek 24). V průběhu diferenciaci nebyl pozorován rozdíl mezi kontrolními liniemi, LP1 a LP2 linií. LP2 linie nabyla shodné morfologie jako ostatní kontrolní buňky. Třetí den po indukci diferenciaci buňky tvoří dlouhé výběžky, které jsou později vzájemně propojeny mezi sebou a s buňkami. Odlišná morfologie jako u původní linie LP2 zde nebyla pozorována.

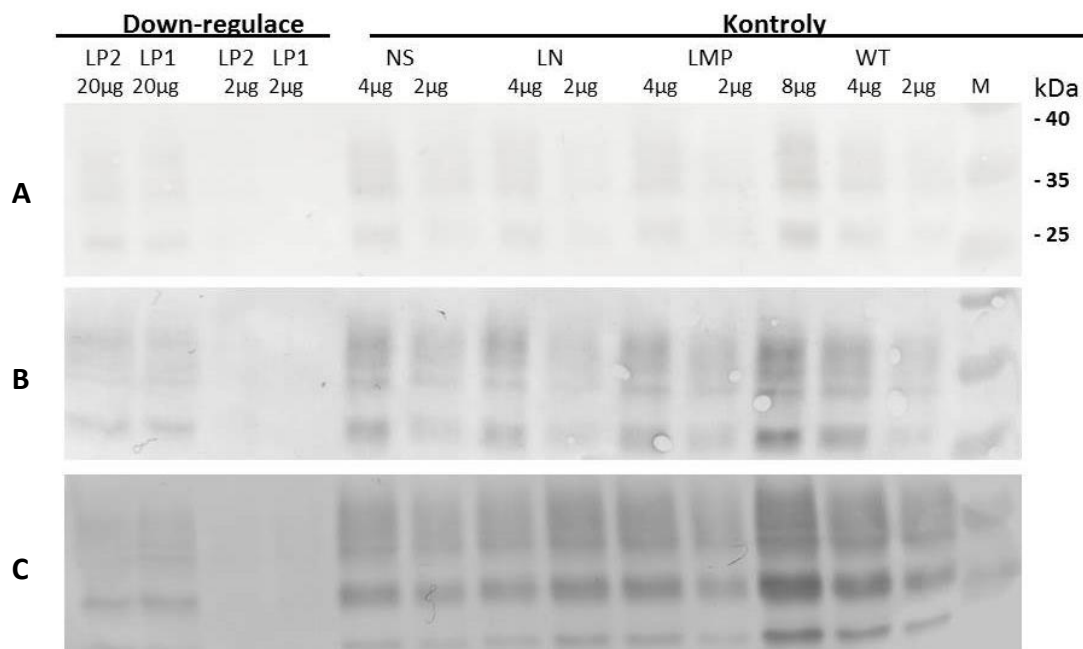


Obrázek 23; Diferenciace nově připravených LP1 a LP2 linií v porovnání s WT. Buňky diferenciované 3 dny – A (WT); C – (LP1); E – (LP2). Buňky diferenciované 6 dnů – B (WT); D – (LP1); F (LP2). Zvětšeno 10x, měřítko 200 μ m.



Obrázek 24; Nově připravené kontrolní transdukované diferenciované linie LMP, NS, LN. Buňky po třídenní diferenciaci – A (LMP); C – (LN); E - (NS). Linie diferenciované 6 dnů – B (LMP); D – (LN); F - (NS). Zvětšeno 10x, měřítko 200 μ m.

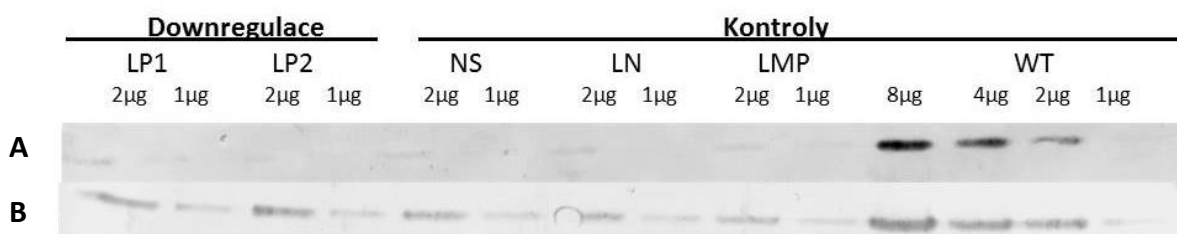
V průběhu diferenciacce dochází u WT buněk CAD 5 k zvýšení množství PrP^C oproti rostoucím buňkám až na pětinasobek. Zda je tento trend patrný i u transdukovaných linií, včetně linií se sníženou expresí PrP^C, byly připraveny western bloty pro v jednotlivé dny diferenciacce (Obrázek 25). Vyrůstající patern exprese PrP^C byl shodně pozorován u všech linií.



Obrázek 25; Expresa PrP^C v průběhu sedmidenní diferenciacce u transdukovaných linií. A – rostoucí linie; B – 1. den diferenciacce; C – 7. Den diferenciacce. Vzorky byly odebírány z kultivační nádoby s plochou 25cm² v 1., 3., 5. a 7. den diferenciacce, společně s rostoucí kontrolou. Na gel bylo nanášeno množství proteinu o uvedené koncentraci na jamku v ředící řadě, koncentrace gelu byla 10% a reakce probíhala za redukujících podmínek. Barveno AH-6, DC-2 a DAM. M=marker.

6.4.2 Expresa GAP-43 u LP1 a LP2 linií

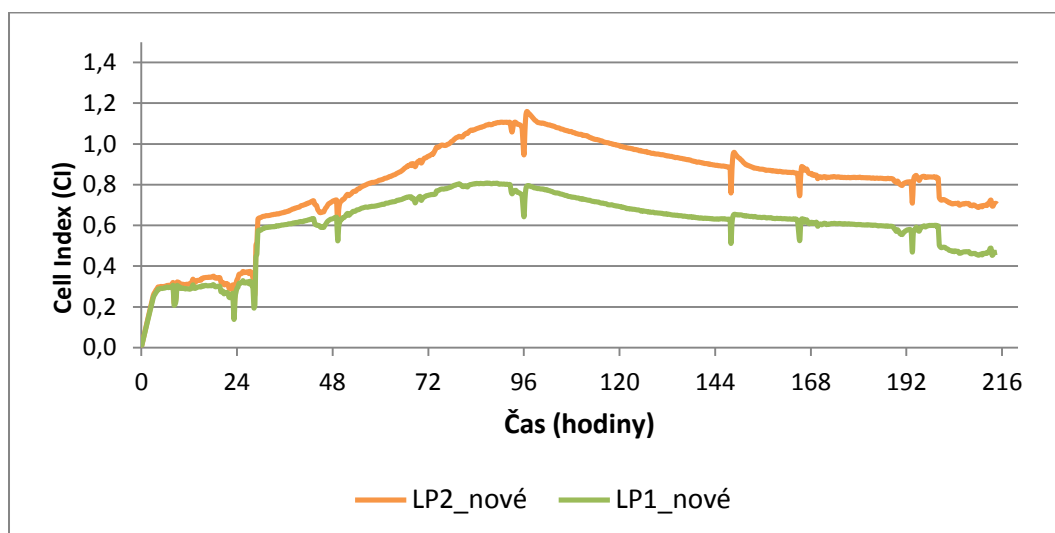
V průběhu sedmidenní diferenciacce byl pozorován nárůst proteinu GAP-43 u WT linie CAD 5. Shodné výsledky byly naměřeny i u linií kontrolních LMP, NS, LN a u buněk se sníženou expresí LP1 a LP2 (Obrázek 26). Množství proteinu shodně vzrůstalo u všech linií.



Obrázek 26; Vyrůstající exprese GAP-43 u down-regulované linie. A – rostoucí linie, B – linie po sedmidenní diferenciacce.

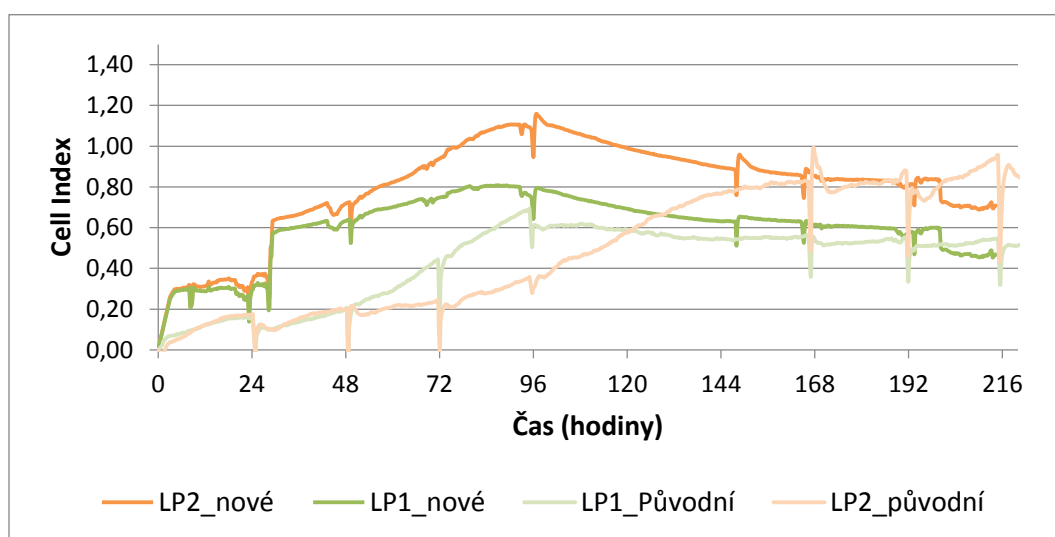
6.4.3 Měření schopnosti diferenciaci nových linií pomocí systému iCELLigence

U nově připravených transdukovaných linií (LP1, LP2, LN, NS, LMP) byla měřena jejich schopnost diferenciaci v nepřítomnosti séra dle shodného protokolu jako u linií původních. Jedinou odlišností v protokolu byla výměna media z jedné poloviny po 24h v průběhu pokusu. Linie LP1 a LP2 shodně diferenciovaly mezi 96. – 120. hodinou (Obrázek 27). Nevznikl zde rozdíl jako u původní linie. Linie LP2 však vykazovala vyšší proliferační aktivitu v prvních dvou dnech diferenciaci.



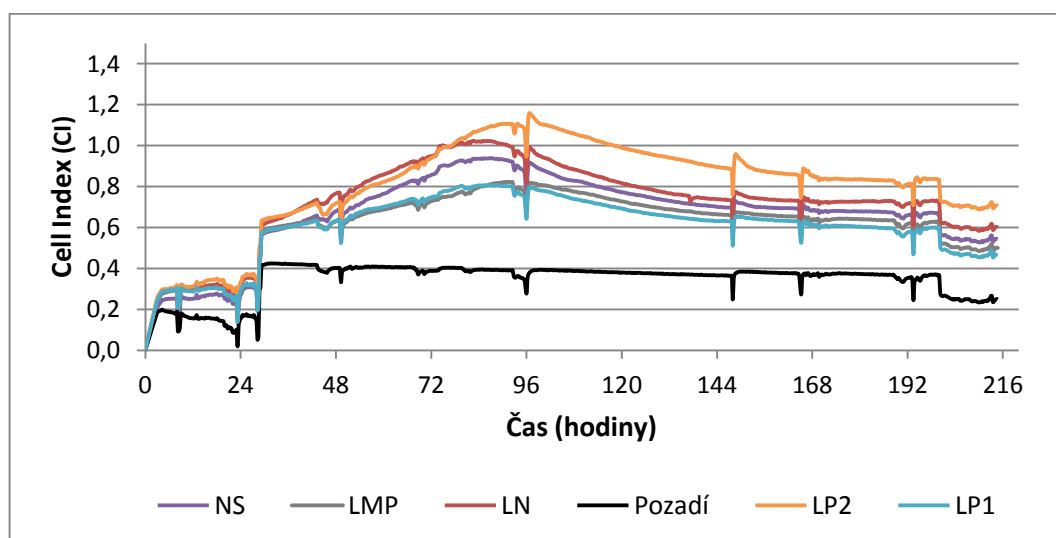
Obrázek 27; Rozdíl v proliferaci v průběhu diferenciaci nově připravených linií LP1 a LP2. Reprezentativní obrázek bez opakování.

Naměřené hodnoty CI byly porovnány s výsledky z předchozího měření pomocí iCELLigence u původních linií LP1 a LP2 (Obrázek 28). Z výsledků vyplývá, že v průběhu původního měření LP1 s LP2 a nově připravené linie LP1 a LP2 dochází k diferenciaci ve shodném časovém úseku. Je zde také shodný rozdíl, který vzniká odlišnou schopností proliferace jak mezi původními, tak mezi nově připravenými liniemi LP1 a LP2. Původní linie LP2 navíc vykazuje pozdější zastavení růstu.



Obrázek 28; Porovnání původních výsledků průběhu diferenciaci původních LP2 a LP1 linií s nově připravenými liniemi LP2 a LP1. Výsledky z původního měření LP1 a LP2 byly porovnány s daty z měření diferenciaci nově připravených linií LP1 a LP2. Reprezentativní obrázek bez opakování.

Nově připravené kontrolní linie vykazovaly shodnou diferenční křivku s liniemi se sníženou expresí LP1 a LP2 (Obrázek 29). Linie LP2 shodně s původní linií LP2 měla před zastavením proliferace nejvyšší hodnoty impedance oproti všem kontrolním liniím. Pro představu změny impedance při změně teploty media bylo současně měřeno i samotné medium. Poklesy v grafu ukazují jednotlivé výměny media, ale i teplotní poklesy z důvodu snížení teploty v inkubačním boxu.



Obrázek 29; Porovnání nově připravených linií LP1 a LP2 se sníženou expresí PrP^C s novými kontrolami NS, LMP, LN v průběhu diferenciace. Reprezentativní obrázek bez opakování.

7 Diskuze

Fyziologická úloha PrP^C v organismu doposud zůstává neobjasněna. Během časného embryonálního vývoje byla exprese PrP^C detekována v různých částech embrya, především pak v nervové soustavě (Manson et al. 1992). U embryonálních buněk byla pozorována vzrůstající exprese proteinu v průběhu diferenciaci (Peralta et al. 2012). Vzniká zde tedy předpoklad, že vývoj buněk by mohl být tímto proteinem ovlivněn.

7.1.1 Diferenciace buněk CAD 5

V této práci byla jako model pro pozorování vlivu exprese PrP^C na vývoj a diferenciaci buněk zvolena myší buněčná linie CAD 5. Imortalizované, katecholaminergní buňky odvozené z nádoru v CNS, propagující detekovatelné množství PrP^{Sc}, jsou schopné diferenciovat do neuronům podobných buněk a exprimovat specifické proteiny pro neurony (Qi et al. 1997; Li et al. 2005; Suri et al. 1993). K indukci diferenciaci bylo z media odebráno sérum, což způsobilo zástavu dělení buněk. Zároveň buňky v mediu bez séra začaly během 24h měnit svou morfologii, po 72h bylo možné pozorovat výběžky u většiny buněk. Tato morfologická změna odpovídala již publikovaným výsledkům (Li et al. 2005; Qi et al. 1997). Oproti nim, bylo pozorováno po sedmidenní diferenciaci buněk při zpětné výměně bez-sérového media za medium se sérem, neschopnost obnovy buněčného dělení u diferenciovaných CAD 5 a postupné odumírání kultury. Se změnou morfologie po indukci diferenciaci, dochází u buněk CAD 5 až k osminásobnému zvýšení množství diferenciačního markeru GAP-43, který se podílí na vývoji neuronů (Skene et al. 1986). Uvedené znaky prokazují, že se podařilo v linii CAD 5 indukovat neuronální diferenciaci.

7.1.2 Změna exprese PrP^C u diferenciovaných buněk CAD 5

Expresí a množství buněčného prionového proteinu se během sedmidenní diferenciaci CAD 5 linie přibližně pětkrát zvyšuje. Zvyšující se množství bylo pozorováno pomocí imunoblotu, kde množství proteinu v průběhu sedmi dnů kontinuálně vzrůstalo. Signifikantní nárůst mezi prvním a posledním dnem ($p=0,0403$) byl detekován také na úrovni mRNA genu *PRNP*, pomocí qPCR. Oproti imunoblotu byl touto metodou pátý den diferenciaci pozorován rozdíl v nárůstu exprese na úrovni mRNA. Množství mRNA pátý den bylo ve stejném či nižším množství jako v den třetí, tento rozdíl však není signifikantní. Je možné, že v průběhu separace mRNA dochází k její částečné degradaci. Následně v sedmý den diferenciaci hladina mRNA stoupala, shodně s imunoblotem.

U buněčných neuronálních kultur, obdobně jako u linií CAD 5, byl pozorován nárůst exprese při indukci diferenciaci, např. při indukci diferenciaci imortalizované myší neuronální linie (HW-8; HW-9) z hipokampu (Kuwahara et al. 2000) nebo při diferenciaci neurosfér z myších buněk CNS (Herva et al. 2010). V kontrastu s těmito výsledky je studie diferenciaci buněk myší neuroektodermální progenitorové linie 1C11. Při diferenciaci progenitorových buněk se oddělily dvě subpopulace- serotogenní, kde došlo k signifikantnímu poklesu exprese PrP^C v průběhu diferenciaci, a katecholaminergní, kde se exprese signifikantně neměnila (Mouillet-Richard et al. 1999). Různá míra exprese PrP^C v průběhu diferenciaci je zřejmě specifická pro každou buněčnou linii. Variabilní exprese u rozdílných buněčných linií by se mohla například podílet na odlišení jednotlivých funkčních typů neuronů.

7.1.3 Vliv snížení exprese PrP^C na diferenciaci buněk CAD 5

Pozorování vlivu PrP^C na diferenciaci buněk CAD 5 bylo založeno na porovnání buněk s fyziologickou expresí PrP^C s buňkami, kde je jeho exprese snížena.

Z linie CAD 5 byly již dříve v naší laboratoři připraveny dvě linie CAD 5 - LP1 a CAD 5 - LP2, které mají pomocí RNA interference o 70-80% nižší množství PrP^C (Panigaj et al. 2011b). Linie LP1 a LP2 byly porovnávány s kontrolními liniemi CAD 5 (LN_{sebr}, LN_{mar}, NS). Tyto linie obsahují vnesenou kontrolní sekvenci shRNAmiR, obdobně jako LP1 a LP2, která se neváže na mRNA PrP^C – nesnižuje množství proteinu. Další kontrolní linií byla CAD 5 - LMP, která má do genomu vložený prázdný vektor.

LP1 a LP2 linie vykazovaly mezi sebou odlišnou buněčnou morfologii. LP1 odpovídala kontrolním liniím, LP1 a kontrolní linie LN, NS, LMP a WT po pětidenní diferenciaci obsahovaly převážně buňky dlouhými výběžky, které se vzájemně propojovaly. Kultura LP2 po pětidenní diferenciaci obsahovala menší procento buněk s dlouhými výběžky, buňky byly propojené krátkými dendrity mezi sebou.

Také průběh diferenciacie linie LP2 měřený metodou iCELLigence se odlišoval od všech ostatních linií. Porovnáním diferenciací křivky vzniklé na základě rozdílu impedance v čase na kultivační ploše, kontrolní linie a LP1 ustálily svůj růst a udržovaly nedělicí se/diferenciovaný stav od 96. - 120. hodiny od začátku měření. Oproti tomu u linií LP2 bylo ustálení růstu opožděno o 48 hodin. LP2 linie vykazovala vyšší proliferační aktivitu a opožděnou schopnost diferenciacie.

Interpretace naměřených hodnot iCELLigence však zcela není jednoduchá a metoda čítá mnoho ovlivňujících faktorů. Prvním problémem v této metodě je nasazení přesného počtu buněk do pokusu. Buňky byly počítány pomocí Bürkerovy komůrky v šesti polích, pro co nejpřesnější počet buněk. Avšak CAD 5 linie často rostou ve shlucích a je obtížné je oddělovat bez přílišného poškození. Proto se množství buněk nasazených do pokusu může lišit. To má například za následek nejednotnou diferenciací křivku kontrolních linií. Shodný problém s nepřesným množstvím nasazených buněk byl také u měření viability jednotlivých linií pomocí CCK-8 assay. Zde se buňky nasazovaly společně v jeden den na čtyři různé destičky a následně byla každý den měřena viabilita. Třetí a čtvrtý den nám vznikají signifikantně odlišné hodnoty viability v porovnání k WT linii, avšak tento rozdíl s určitostí vzniká právě nepřesným nasazením stejného množství buněk do pokusu.

Druhým faktorem je samotné měření pomocí iCELLigence. Teoretický předpoklad je, že hodnota cell index (CI) má zobrazovat změny v počtu buněk. V průběhu diferenciacie sice dochází zástavě proliferace, ale buňky zároveň mění i svou morfologii a adherenci k povrchu, a všechny tyto faktory ovlivňují CI, které tak nemůže přímo úměrně odpovídat množství buněk. V neposlední řadě mikroelektrody jsou vysoce citlivé na změny teploty, které jsou zaznamenány jako odlišná hodnota CI. Přes všechny limitace této metody však linie LP2 vždy prokazatelně vykazovala odlišnou schopnost proliferovat a diferenciovat.

Odlišná schopnost proliferovat/diferenciovat transdukované linie LP2 mohla být způsobena během přípravy těchto linií. Lentivirová infekce je náhodná v místě a v množství vložených inzertů do buňky (Vigna a Naldini 2000). V průběhu transdukce mohlo dojít k porušení genové oblasti, která způsobila odlišnou morfologii a růstové/diferenciací vlastnosti. Následně mohlo

v kultuře dojít k vyselektování morfologicky odlišného typu. Druhou možností vzniku rozdílné linie LP2 je nevhodná sekvence shRNA pro LP2, která by se nespecificky vážala i na jiné mRNA v buňce a ovlivňovala by syntézu dalších proteinů. U myších erytroleukemických buněk (MEL), kde byla zkoumána exprese *PRNP* během diferenciaci, byly pro snížení exprese využity stejné sekvence shRNAmiR – LP1 a LP2 (Panigaj et al. 2011a). Transdukované linie MEL-LP1 a MEL-LP2 měly shodnou viabilitu a růstovou křivku, avšak linie MEL-LP2 vykazovala vyšší proliferační kapacitu než kontroly a MEL-LP1 (Panigaj et al. 2011a). Tento výsledek koreluje s výsledky této práce, kdy CAD 5 - LP2 linie v průběhu měření diferenciaci na iCELLigence vykazovala vyšší proliferační aktivitu a opožděný přechod do diferenciované fáze.

Pro objasnění, zda za rozdíly v průběhu diferenciaci mezi liniemi stojí nevhodná sekvence či nevhodné místo inkorporace do genomu, byly nově připraveny CAD 5 linie se sníženou expresí - LP1, LP2 a kontrolní LMP, NS, LN.

Snížení exprese bylo ověřeno pomocí imunoblotu, které toto snížení prokázalo. Při morfologické studii nebyl pozorován rozdíl mezi LP2 a LP1 a kontrolními liniemi. Avšak v průběhu měření růstu a diferenciaci metodou iCELLigence LP2 linie vykazovala opět vyšší proliferační aktivitu, než ostatní linie. Oproti původní linii LP2 však zástava růstu u nově připravené linie proběhla shodně s linií LP1 a kontrolními liniemi. Za odlišnými růstovými vlastnostmi patrně stojí nevhodná sekvence shRNAmiR, která ovlivňuje proliferační dynamiku LP2 linie. Jelikož při opakované přípravě linií se morfologie diferenciovaných buněk LP2 neodlišovala, lze předpokládat, že v první linii vznikla v průběhu transfekce subpopulace buněk, která se morfologicky odlišuje a zároveň obsahuje nevhodnou sekvenci shRNA. Pro následné studie vlivu exprese PrP^C je proto zapotřebí vytvořit model buněk, kde exprese bude snížena či úplně pozastavena bez možnosti ovlivnění proteosyntézy. Jednou z alternativ je například možnost využití CRISPR metody, při které by byl gen *PRNP* z buněk zcela odstraněn (Damian a Porteus 2013).

7.1.4 Vliv infekce RML na diferenciaci buněk CAD 5

Mechanismus degradace nervové tkáně, provázející prionová onemocnění, zůstává neobjasněna. V průběhu onemocnění dochází k odumírání diferenciovaných buněk této tkáně, proto se druhá část práce věnovala vlivu prionové infekce na diferenciaci. Jak prionová infekce ovlivňuje buněčnou diferenciaci, zůstává prozatím neznámým polem prionových chorob. Například u neurosféry docházelo u diferenciovaných buněk myší CNS k zvyšování množství infekčního kmene RML, na rozdíl od rostoucích buněk (Herva et al. 2010). Ovčí mezenchymální kmenové buňky (MSC), přirozeně infikované klusavkou, vykazovaly nižší proliferační kapacitu od neinfikovaných kontrol a v průběhu diferenciaci MCS do buněk podobných neuronům, bylo v infikovaných MSC detekováno nižší množství neuronálních markerů (Mediano et al. 2015).

V této práci byly porovnávány linie CAD 5 chronicky infikované pomocí kmenu prionu RML se zdravou linií CAD 5. V sérii slepých testů byly morfologicky vyhodnocovány fotografie zdravých a infikovaných linií. V séru rostoucí zdravé a infikované buňky byly shodné u obou linií. Rozdíl byl pozorován u linií infikovaných v průběhu diferenciaci. Pátý den diferenciaci bylo u RML linie detekováno méně buněk protáhlého tvaru s dlouhými výběžky, než u zdravé linie. Sedmý den již byla morfologie shodná mezi oběma liniemi. Je možné, že snížené množství funkčního proteinu pozdržuje proces diferenciaci. Tento rozdíl však nekorespondoval s výsledky z iCELLigence, kde růst i průběh diferenciaci byl obdobný, odlišná proliferační a diferenciaci kapacita nebyla

pozorována. Také exprese neuron-specifického diferenciačního markeru GAP-43 byla shodná mezi infikovanými a zdravými liniemi. Dalším možným postupem v porovnání RML infikované linie se zdravou, by bylo ověření exprese diferenciačního markeru GAP-43 na úrovni mRNA. Mohl by zde vznikat malý, ale signifikantní rozdíl, který na úrovni proteinu vizualizovaného pomocí western blotu nemusí být detekován.

8 Závěr

Prvním cílem této práce bylo zjištění, zda exprese PrP^C má vliv na diferenciaci buněčné kultury CAD 5. Bylo zjištěno, že v průběhu diferenciacie linie CAD 5 množství exprese PrP^C stoupá. Linie CAD 5 je schopná diferenciovat v neuronální linii, která exprimuje neuron specifický protein GAP-43, jehož množství v průběhu diferenciacie stoupá také. Avšak snížení exprese PrP^C na 20-30% normální hladiny pomocí RNA interference neprokázalo vliv na buněčnou diferenciaci. Je možné, že zbytkové množství PrP^C stačí pro zajištění funkce a proto nepozorujeme vliv snížené exprese. Pro budoucí výzkum bude zajímavé tento gen zcela odstranit a porovnat naměřené hodnoty s buňkami, které mají „pouze“ expresi sníženou či běžnou. Zcela odstraněný gen by mohl umožnit zachycení případného vlivu PrP^C na diferenciaci.

Linie se sníženou expresí pomocí lentivirového vektoru nebyly zcela vhodným modelem pro studium vlivu PrP^C na diferenciaci. Nevýhodou využití lentivirového vektoru je náhodné vložení transgenů do genomu a s tím spojená možnost jeho poškození. Podstatná část úspěšného snížení exprese pouze daného proteinu závisí také na vlastní sekvenci shRNAmiR. V této práci byla použita sekvence shRNAmiR pro LP2 linii, která se později ukázala jako nevyhovující, jelikož poskytovala linii CAD 5 - LP2 proliferační výhodu oproti linii CAD 5 - LP1 a ostatním transdukovaným kontrolám.

Druhým cílem bylo zjištění vlivu prionové infekce na diferenciaci buněčné kultury CAD 5. Zde bylo poukázáno na odlišnou morfolologii RML kmenem infikovaných CAD 5 buněk, která však nekorespondovala s růstovými a diferenciačními vlastnostmi a expresí diferenciačního markeru GAP-43.

Souhrnem, snížení exprese PrP^C u linie CAD 5 pomocí lentivirového systému neprokázalo vliv na expresi PrP^C. Infikované linie, které obsahují infekční RML kmen, vykazují odlišnosti v morfolologii a měly by být předmětem dalšího výzkumu.

9 Reference

ALLAIS-BONNET, Aurélie a Eric PAILHOUX, 2014. Role of the prion protein family in the gonads. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. roč. 2, s. 56. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2014.00056

ARIMA, Kazuhiko, Noriyuki NISHIDA, Suehiro SAKAGUCHI, Kazuto SHIGEMATSU, Ryuichiro ATARASHI, Naohiro YAMAGUCHI, Daisuke YOSHIKAWA, Jaewoo YOON, Ken WATANABE, Nobuyuki KOBAYASHI, Sophie MOUILLET-RICHARD, Sylvain LEHMANN a Shigeru KATAMINE, 2005. Biological and Biochemical Characteristics of Prion Strains Conserved in Persistently Infected Cell Cultures. *Journal of Virology* [online]. 1.6., roč. 79, č. 11, s. 7104–7112. ISSN 0022-538X, 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.79.11.7104-7112.2005

AUCOUTURIER, Pierre a Claude CARNAUD, 2002. The immune system and prion diseases: a relationship of complicity and blindness. *Journal of Leukocyte Biology*. 1.12., roč. 72, č. 6, s. 1075–1083. ISSN 0741-5400, 1938-3673.

BAROŠ, Aleš a Martina HASALÍKOVÁ, 2010. *Poznejte demenci správně a včas - příručka pro klinickou praxi* [online] [vid. 11. duben 2016]. Dostupné z: <http://www.databazeknih.cz/knihy/poznejte-demenci-spravne-a-vcas-prirucka-pro-klinickou-praxi-187329>

BREMER, Juliane, Frank BAUMANN, Cinzia TIBERI, Carsten WESSIG, Heike FISCHER, Petra SCHWARZ, Andrew D STEELE, Klaus V TOYKA, Klaus-Armin NAVE, Joachim WEIS a Adriano AGUZZI, 2010. Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nature Neuroscience* [online]. 3., roč. 13, č. 3, s. 310–318. ISSN 1546-1726. Dostupné z: doi:10.1038/nn.2483

BRIBIÁN, Ana, Xavier FONTANA, Franc LLORENS, Rosalina GAVÍN, Manuel REINA, José Manuel GARCÍA-VERDUGO, Juan María TORRES, Fernando DE CASTRO a José Antonio del RÍO, 2012. Role of the Cellular Prion Protein in Oligodendrocyte Precursor Cell Proliferation and Differentiation in the Developing and Adult Mouse CNS. *PLoS ONE* [online]. 18.4., roč. 7, č. 4, s. e33872. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0033872

BROWN, David R., Kefeng QIN, Jochen W. HERMS, Axel MADLUNG, Jean MANSON, Robert STROME, Paul E. FRASER, Theo KRUCK, Alex VON BOHLEN, Walter SCHULZ-SCHAEFFER, Armin GIESE, David WESTAWAY a Hans KRETZSCHMAR, 1997. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*. 18.12., roč. 390, č. 6661, s. 684. ISSN 00280836.

BÜELER, Hansruedi, Marek FISCHER, Yolande LANG, Horst BLUETHMANN, Hans-Peter LIPP, Stephen J. DEARMOND, Stanley B. PRUSINER, Michel AGUET a Charles WEISSMANN, 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* [online]. 16.4., roč. 356, č. 6370, s. 577–582. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/356577a0

COLLINGE, John, 2001. PRION DISEASES OF HUMANS AND ANIMALS: Their Causes and Molecular Basis. *Annual Review of Neuroscience* [online]. roč. 24, č. 1, s. 519–550. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.519

COLLINGE, John a Anthony R. CLARKE, 2007. A General Model of Prion Strains and Their Pathogenicity. *Science* [online]. 9.11., roč. 318, č. 5852, s. 930–936. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1138718

COLLINGE, John, Miles A. WHITTINGTON, Katie C. L. SIDLE, Corinne J. SMITH, Mark S. PALMER, Anthony R. CLARKE a John G. R. JEFFERYS, 1994. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* [online]. 28.7., roč. 370, č. 6487, s. 295–297. Dostupné z: doi:10.1038/370295a0

DAMIAN, Mara a Matthew H PORTEUS, 2013. A Crisper Look at Genome Editing: RNA-guided Genome Modification. *Molecular Therapy* [online]. 4., roč. 21, č. 4, s. 720–722. ISSN 1525-0016. Dostupné z: doi:10.1038/mt.2013.46

DODELET, Vincent C. a Neil R. CASHMAN, 1998. Prion Protein Expression in Human Leukocyte Differentiation. *Blood*. 1.3., roč. 91, č. 5, s. 1556–1561. ISSN 0006-4971, 1528-0020.

GAUCZYNSKI, Sabine, Jean-Michel PEYRIN, Stéphane HAÏK, Christoph LEUCHT, Christoph HUNDT, Roman RIEGER, Susanne KRASEMANN, Jean-Philippe DESLYS, Dominique DORMONT, Corinne Ida LASMEZAS a Stefan WEISS, 2001. The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *The EMBO Journal* [online]. 1.11., roč. 20, č. 21, s. 5863–5875. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/20.21.5863

GOEDERT, Michel, Florence CLAVAGUERA a Markus TOLNAY, 2010. The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends in Neurosciences* [online]. 7., roč. 33, č. 7, s. 317–325. ISSN 0166-2236. Dostupné z: doi:10.1016/j.tins.2010.04.003

HANUSOVA, Z., J. KUCEROVA, M. FILIPOVA, Z. JINDROVA a K. HOLADA, 2015. Prion Protein, its Role in Cellular Proliferation, Differentiation and Nervous System Development. *Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie*. roč. 78, č. 4, s. 406–412. ISSN 1210-7859.

HARRIS, David A, 2003. Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *British Medical Bulletin*. roč. 66, s. 71–85. ISSN 0007-1420.

HERVA, Maria Eugenia, Aroa RELAÑO-GINÉS, Ana VILLA a Juan María TORRES, 2010. Prion infection of differentiated neurospheres. *Journal of Neuroscience Methods* [online]. 15.5., roč. 188, č. 2, s. 270–275. ISSN 0165-0270. Dostupné z: doi:10.1016/j.jneumeth.2010.02.022

HETZ, Claudio, Kinsey MAUNDRELL a Claudio SOTO, 2003. Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? *Trends in Molecular Medicine* [online]. 6., roč. 9, č. 6, s. 237–243. ISSN 1471-4914. Dostupné z: doi:10.1016/S1471-4914(03)00069-8

HIDAKA, Kyoko, Manabu SHIRAI, Jong-Kook LEE, Takanari WAKAYAMA, Itsuo KODAMA, Michael D. SCHNEIDER a Takayuki MORISAKI, 2010. The Cellular Prion Protein Identifies Bipotential Cardiomyogenic Progenitors. *Circulation Research* [online]. 8.1., roč. 106, č. 1, s. 111–119. ISSN 0009-7330, 1524-4571. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.209478

CHOI, Christopher J., Arthi KANTHASAMY, Vellareddy ANANTHARAM a Anumantha G. KANTHASAMY, 2006. Interaction of metals with prion protein: Possible role of divalent cations in the pathogenesis of Prion diseases. *Neurotoxicology* [online]. 9., roč. 27, č. 5, s. 777–787. ISSN 0161-813X. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuro.2006.06.004

IMRAN, Muhammad a Saqib MAHMOOD, 2011. An overview of human prion diseases. *Virology Journal* [online]. 24.12., roč. 8, č. 1, s. 559. ISSN 1743-422X. Dostupné z: doi:10.1186/1743-422X-8-559

JINDROVA, Z., 2016. Morfologie CAD5 buněk. *unpublished*.

KANAANI, Jamil, Stanley B. PRUSINER, Julia DIACOVO, Steinunn BAEKKESKOV a Giuseppe LEGNAME, 2005. Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. *Journal of Neurochemistry* [online]. 1.12., roč. 95, č. 5, s. 1373–1386. ISSN 1471-4159. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03469.x

KHALIFE, Manal, Rachel YOUNG, Bruno PASSET, Sophie HALLIEZ, Marthe VILOTTE, Florence JAFFREZIC, Sylvain MARTHEY, Vincent BERINGUE, Daniel VAIMAN, Fabienne LE PROVOST, Hubert LAUDE a Jean-Luc VILOTTE, 2011. Transcriptomic Analysis Brings New Insight into the Biological Role of the Prion Protein during Mouse Embryogenesis. *Plos One* [online]. 15.8., roč. 6, č. 8, s. e23253. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0023253

KURSCHNER, Cornelia a James I. MORGAN, 1995. The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Molecular Brain Research* [online]. 5., roč. 30, č. 1, s. 165–168. ISSN 0169-328X. Dostupné z: doi:10.1016/0169-328X(95)00013-I

KUWAHARA, Chieko, Atsutaka KUBOSAKI, Takuya NISHIMURA, Yukiko NASU, Yuko NAKAMURA, Keiichi SAEKI, Yoshitsugu MATSUMOTO a Takashi ONODERA, 2000. Enhanced Expression of Cellular Prion Protein Gene by Insulin or Nerve Growth Factor in Immortalized Mouse Neuronal Precursor Cell Lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 24.2., roč. 268, č. 3, s. 763–766. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.2000.2152

LASMEZAS, Corinne I., Jean-Philippe DESLYS, Olivier ROBAIN, Alexandre JAEGLY a et AL, 1997. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*. 17.1., roč. 275, č. 5298, s. 402–5. ISSN 00368075.

LEE, Young Jin a Ilia V. BASKAKOV, 2010. Treatment with normal prion protein delays differentiation and helps to maintain high proliferation activity in human embryonic stem cells. *Journal of Neurochemistry* [online]. roč. 114, č. 2, s. 362–373. ISSN 1471-4159. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06601.x

LEE, Young Jin a Ilia V. BASKAKOV, 2013. The cellular form of the prion protein is involved in controlling cell cycle dynamics, self-renewal, and the fate of human embryonic stem cell differentiation. *Journal of Neurochemistry* [online]. 2., roč. 124, č. 3, s. 310–322. ISSN 0022-3042. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07913.x

LINDEN, Rafael, Vilma R. MARTINS, Marco A. M. PRADO, Martín CAMMAROTA, Iván IZQUIERDO a Ricardo R. BRENTANI, 2008. Physiology of the Prion Protein. *Physiological Reviews* [online]. 1.4., roč. 88, č. 2, s. 673–728. ISSN 0031-9333, 1522-1210. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00007.2007

LIU, Tong, Ruliang LI, Boon-Seng WONG, Dacai LIU, Tao PAN, Robert B. PETERSEN, Pierluigi GAMBETTI a Man-Sun SY, 2001. Normal Cellular Prion Protein Is Preferentially Expressed on Subpopulations of Murine Hemopoietic Cells. *The Journal of Immunology* [online]. 15.3., roč. 166, č. 6, s. 3733–3742. ISSN 0022-1767, 1550-6606. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.166.6.3733

LI, Yongling, Linda Xiu-E. HOU, Annika AKTIV a Annica DAHLSTRÖM, 2005. Immunohistochemical characterisation of differentiated CAD cells: expression of peptides and chromogranins. *Histochemistry and Cell Biology* [online]. 9.7., roč. 124, č. 1, s. 25–33. ISSN 0948-6143, 1432-119X. Dostupné z: doi:10.1007/s00418-005-0017-9

MABBOTT, N. A. a G. G. MACPHERSON, 2006. Prions and their lethal journey to the brain. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 3., roč. 4, č. 3, s. 201–211. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro1346

MAHAL, Sukhvir P., Christopher A. BAKER, Cheryl A. DEMCZYK, Emery W. SMITH, Christian JULIUS a Charles WEISSMANN, 2007. Prion strain discrimination in cell culture: The cell panel assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 26.12., roč. 104, č. 52, s. 20908–20913. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0710054104

MANSON, J., J. D. WEST, V. THOMSON, P. MCBRIDE, M. H. KAUFMAN a J. HOPE, 1992. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development*. 1.5., roč. 115, č. 1, s. 117–122. ISSN 0950-1991, 1477-9129.

MEDIANO, Diego R., David SANZ-RUBIO, Rosa BOLEA, Belen MARIN, Francisco J. VAZQUEZ, Ana R. REMACHA, Oscar LOPEZ-PEREZ, Natalia FERNANDEZ-BORGES, Joaquin CASTILLA, Pilar ZARAGOZA, Juan J. BADIOLA, Clementina RODELLAR a Inmaculada MARTIN-BURRIEL, 2015. Characterization of mesenchymal stem cells in sheep naturally infected with scrapie. *Journal of General Virology* [online]. 12., roč. 96, s. 3715–3726. ISSN 0022-1317. Dostupné z: doi:10.1099/jgv.0.000292

MIRANDA, Alberto, Eva PERICUESTA, Miguel Ángel RAMÍREZ a Alfonso GUTIERREZ-ADAN, 2011. Prion Protein Expression Regulates Embryonic Stem Cell Pluripotency and Differentiation. *PLoS ONE* [online]. 4.4., roč. 6, č. 4, s. e18422. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0018422

MONNET, Céline, Julie GAVARD, René-Marc MÈGE a André SOBEL, 2004. Clustering of cellular prion protein induces ERK1/2 and stathmin phosphorylation in GT1-7 neuronal cells. *FEBS Letters* [online]. 8.10., roč. 576, č. 1-2, s. 114–118. ISSN 1873-3468. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2004.08.076

MOUILLET-RICHARD, S., I. LAURENDEAU, M. VIDAUD, O. KELLERMANN a J. L. LAPLANCHE, 1999. Prion protein and neuronal differentiation: quantitative analysis of prnp gene expression in a

murine inducible neuroectodermal progenitor. *Microbes and Infection* [online]. 10., roč. 1, č. 12, s. 969–976. ISSN 1286-4579. Dostupné z: doi:10.1016/S1286-4579(99)80514-0

NASLAVSKY, Naava, Ronit STEIN, Anat YANAI, Gilgi FRIEDLANDER a Albert TARABOULOS, 1997. Characterization of Detergent-insoluble Complexes Containing the Cellular Prion Protein and Its Scrapie Isoform. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 7.3., roč. 272, č. 10, s. 6324–6331. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.10.6324

NISHIDA, Noriyuki, Shigeru KATAMINE, Kazuto SHIGEMATSU, Akira NAKATANI, Nobuhiro SAKAMOTO, Sumitaka HASEGAWA, Ryota NAKAOKE, Ryuichiro ATARASHI, Yasufumi KATAOKA a Tsutomu MIYAMOTO, 1997. [No Title]. *Cellular and Molecular Neurobiology* [online]. roč. 17, č. 5, s. 537–545. ISSN 02724340. Dostupné z: doi:10.1023/A:1026315006619

PANIGAJ, Martin, Hana GLIER, Marcela WILDOVA a Karel HOLADA, 2011a. Expression of Prion Protein in Mouse Erythroid Progenitors and Differentiating Murine Erythroleukemia Cells. *PLoS ONE* [online]. 2.9., roč. 6, č. 9, s. e24599. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0024599

PANIGAJ, Martin, Karlova UNIVERZITA a věd České republiky AKADEMIE, 2011b. *The Role of Cellular Prion Protein in Erythroid Differentiation*. Praha,

PAN, K. M., M. BALDWIN, J. NGUYEN, M. GASSET, A. SERBAN, D. GROTH, I. MEHLHORN, Z. HUANG, R. J. FLETTERICK a F. E. COHEN, 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1.12., roč. 90, č. 23, s. 10962–10966. ISSN 0027-8424, 1091-6490.

PAULY, Peter C. a David A. HARRIS, 1998. Copper Stimulates Endocytosis of the Prion Protein. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 11.12., roč. 273, č. 50, s. 33107–33110. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.273.50.33107

PERALTA, Oscar A, William R HUCKLE a Willard H EYESTONE, 2011. Expression and knockdown of cellular prion protein (PrPC) in differentiating mouse embryonic stem cells. *Differentiation; research in biological diversity* [online]. 1., roč. 81, č. 1, s. 68–77. ISSN 1432-0436. Dostupné z: doi:10.1016/j.diff.2010.09.181

PERALTA, Oscar A., William R. HUCKLE a Willard H. EYESTONE, 2012. Developmental expression of the cellular prion protein (PrPC) in bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* [online]. 7., roč. 79, č. 7, s. 488–498. ISSN 1040-452X. Dostupné z: doi:10.1002/mrd.22057

PRODROMIDOU, Kanella, Florentia PAPASTEFANAKI, Theodoros SKLAVIADIS a Rebecca MATSAS, 2014. Functional cross-talk between the cellular prion protein and the neural cell adhesion molecule NCAM is critical for neuronal differentiation of neural stem/precursor cells. *STEM CELLS* [online]. 1.2., s. n/a–n/a. ISSN 1549-4918. Dostupné z: doi:10.1002/stem.1663

PRUSINER, Stanley B., 1982. Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie. *Science*. 9.4., roč. 216, č. 4542, New Series, s. 136–144. ISSN 0036-8075.

PUCKETT, C, P CONCANNON, C CASEY a L HOOD, 1991. Genomic structure of the human prion protein gene. *American Journal of Human Genetics*. 8., roč. 49, č. 2, s. 320–329. ISSN 0002-9297.

QI, Y. P., J. K. T. WANG, M. MCMILLIAN a D. M. CHIKARAISHI, 1997. Characterization of a CNS cell line, CAD, in which morphological differentiation is initiated by serum deprivation. *Journal of Neuroscience*. 15.2., roč. 17, č. 4, s. 1217–1225. ISSN 0270-6474.

ROHAN, Z., E. PAROBKAVÁ, S. JOHANIDESOVÁ, F. KOUKOLÍK, R. MATĚJ a R. RUSINA, 2013. Lidské prionové nemoci v České republice – 10 let zkušeností s diagnostikou. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. roč. 76, č. 3, s. 300–306. ISSN 1210-7859; 1802-4041.

ROSS, C. A. a M. A. POIRIER, 2004. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine* [online]. 7., roč. 10, č. 7, s. S10–S17. ISSN 1078-8956. Dostupné z: doi:10.1038/nm1066

SANTOS, Tiago G., Iara R. SILVA, Bruno COSTA-SILVA, Ana Paula LEPIQUE, Vilma R. MARTINS a Marilene H. LOPES, 2011. Enhanced Neural Progenitor/Stem Cells Self-Renewal via the Interaction of Stress-Inducible Protein 1 with the Prion Protein. *STEM CELLS* [online]. 1.7., roč. 29, č. 7, s. 1126–1136. ISSN 1549-4918. Dostupné z: doi:10.1002/stem.664

SANTUCCIONE, Antonella, Vladimir SYTNYK, Iryna LESHCHYNS'KA a Melitta SCHACHNER, 2005. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *The Journal of Cell Biology* [online]. 25.4., roč. 169, č. 2, s. 341–354. ISSN 0021-9525, 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.200409127

SCHMITT-ULMS, G., G. LEGNAME, M. A. BALDWIN, H. L. BALL, N. BRADON, P. J. BOSQUE, K. L. CROSSIN, G. M. EDELMAN, S. J. DEARMOND, F. E. COHEN a S. B. PRUSINER, 2001. Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *Journal of Molecular Biology* [online]. 14.12., roč. 314, č. 5, s. 1209–1225. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1006/jmbi.2001.5183

SINGH, Jogender a Jayant B. UDGAONKAR, 2015. Molecular Mechanism of the Misfolding and Oligomerization of the Prion Protein: Current Understanding and Its Implications. *Biochemistry* [online]. 28.7., roč. 54, č. 29, s. 4431–4442. ISSN 1520-4995. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biochem.5b00605

SKENE, J. H., R. D. JACOBSON, G. J. SNIPES, C. B. MCGUIRE, J. J. NORDEN a J. A. FREEMAN, 1986. A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes. *Science* [online]. 15.8., roč. 233, č. 4765, s. 783–786. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.3738509

SPARKES, Rs, M. SIMON, Vh COHN, Rek FOURNIER, J. LEM, I. KLISAK, C. HEINZMANN, C. BLATT, M. LUCERO, T. MOHANDAS, Sj DEARMOND, D. WESTAWAY, Sb PRUSINER a Lp WEINER, 1986. Assignment of the Human and Mouse Prion Protein Genes to Homologous Chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 10., roč. 83, č. 19, s. 7358–7362. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.83.19.7358

STAHL, N. a S. B. PRUSINER, 1991. Prions and prion proteins. *The FASEB Journal*. 1.10., roč. 5, č. 13, s. 2799–2807. ISSN 0892-6638, 1530-6860.

STEELE, Andrew D., Jason G. EMSLEY, P. Hande ÖZDINLER, Susan LINDQUIST a Jeffrey D. MACKLIS, 2006. Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during

developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 28.2., roč. 103, č. 9, s. 3416–3421. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0511290103

STELLA, Roberto, Maria Lina MASSIMINO, Marco SANDRI, M. Catia SORGATO a Alessandro BERTOLI, 2010. Cellular Prion Protein Promotes Regeneration of Adult Muscle Tissue. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 15.10., roč. 30, č. 20, s. 4864–4876. ISSN 0270-7306, 1098-5549. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.01040-09

SURI, C., B. P. FUNG, A. S. TISCHLER a D. M. CHIKARAISHI, 1993. Catecholaminergic cell lines from the brain and adrenal glands of tyrosine hydroxylase-SV40 T antigen transgenic mice. *The Journal of Neuroscience*. 1.3., roč. 13, č. 3, s. 1280–1291. ISSN 0270-6474, 1529-2401.

TOBLER, I., S. E. GAUS, T. DEBOER, P. ACHERMANN, M. FISCHER, T. RÜLICHE, M. MOSER, B. OESCH, P. A. MCBRIDE a J. C. MANSON, 1996. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* [online]. 18.4., roč. 380, č. 6575, s. 639–642. Dostupné z: doi:10.1038/380639a0

TREMBLAY, Patrick, Essia BOUZAMONDO-BERNSTEIN, Cornelia HEINRICH, Stanley B. PRUSINER a Stephen J. DEARMOND, 2007. Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo. *Brain Research* [online]. 30.3., roč. 1139, s. 60–67. ISSN 0006-8993. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainres.2006.12.055

VIGNA, Elisa a Luigi NALDINI, 2000. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *Journal of Gene Medicine*. 10., roč. 2, č. 5, s. 308–16. ISSN 1099498X.

WILSON, Donald A. a Ralph A. NIXON, 2009. Sniffing out a function for prion proteins. *Nature Neuroscience* [online]. 1., roč. 12, č. 1, s. 7–8. ISSN 10976256. Dostupné z: doi:http://dx.doi.org/10.1038/nn0109-7

WITUSIK, Monika, Sylwia M GRESNER, Krystyna HULAS-BIGOSZEWSKA, Barbara KRYNSKA, S Ausim AZIZI, Pawel P LIBERSKI, Paul BROWN a Piotr RIESKE, 2007. Neuronal and astrocytic cells, obtained after differentiation of human neural GFAP-positive progenitors, present heterogeneous expression of PrPc. *Brain research* [online]. 12., roč. 1186, s. 65–73. ISSN 0006-8993. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainres.2007.10.039

ZABEL, Mark D. a Crystal REID, 2015. A brief history of prions. *Pathogens and Disease* [online]. 1.12., roč. 73, č. 9, s. ftv087. ISSN 2049-632X, 2049-632X. Dostupné z: doi:10.1093/femspd/ftv087

ZHANG, Cheng Cheng, Andrew D. STEELE, Susan LINDQUIST a Harvey F. LODISH, 2006. Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 14.2., roč. 103, č. 7, s. 2184–2189. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0510577103

ZHANG, Yan, Seong-Oh KIM, Sibylle OPSAHL-VITAL, Sunita P. HO, Jean-Baptiste SOURON, Charles KIM, Kurt GILES a Pamela K. DEN BESTEN, 2011. Multiple effects of the cellular prion protein on tooth development. *The International Journal of Developmental Biology* [online]. roč. 55, č. 10-11-12, s. 953–960. ISSN 0214-6282. Dostupné z: doi:10.1387/ijdb.113348yz